

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTISENESCENTE DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
FIBROBLÁSTICO-2 (FGF-2) MEDIANTE LA CARACTERIZACIÓN
INMUNOFENOTÍPICA DE UN CULTIVO DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES DE GELATINA DE WHARTON (CMM-gW)**

ANDREA CATALINA RUBIO VARGAS

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título
Biólogo**

Director

**JESSICA PAOLA ALCÁZAR
cMSc**

Co- Director

**LILIANA FRANCIS TURNER
PhD En Fisiología Animal**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
IBAGUÉ-TOLIMA**

2018



FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTISENESCENTE DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO-2 (FGF-2) MEDIANTE LA
CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE UN CULTIVO DE CÉLULAS
MADRE MESENQUIMALES DE GELATINA DE WHARTON (CMM-gW)

AUTORES Andrea Catalina Rubio Vargas (070100332011)

DIRECTOR Jessica Paola Alcázar (Universidad del Tolima)

CO-DIRECTOR Liliana Francis Turner (Universidad del Tolima)

JURADOS Marisol Campuzano Castellanos
Diana Alejandra Quintero Espinosa

CALIFICACIÓN 4,9 (cuatro nueve)

☒ APROBADO

☐ REPROBADO

OBSERVACIONES.

FIRMAS

Marisol Campuzano C.
JURADO 1.

[Firma]
Director del trabajo

[Firma]
JURADO 2.

[Firma]
Director del Programa

Ciudad y fecha: Ibagué, 11 mayo 2018

A Dios por sus infinitas bendiciones, por darme vida por medio de unos padres maravillosos, por darme paciencia en los momentos de turbulencia, por no permitirme desfallecer, porque a pesar de las adversidades, los planes sus tiempos son perfectos.

A Jesucristo, porque me llenas de vida y amor.

AGRADECIMIENTOS

“El agradecimiento es la memoria del corazón” Lao-Tsé

Gracias a Dios por guiar mis pasos y darme la sabiduría y la resiliencia necesaria para alcanzar mis metas.

A mis padres, por apoyar mis decisiones, por enseñarme más que con palabras con actos, por su fortaleza y su empuje para sobrellevar las adversidades de la vida.

A mi hermano por su ternura, por enseñarme día a día a cuestionarme y sorprenderme de las pequeñas cosas, y a descubrir que el universo se pinta de diferentes colores y matices,

A mi abuelita, por su comprensión y por compartirme su sabiduría, su fe y su espiritualidad.

A Santiago Delgado por su amor, por estar en los momentos de duda y hacerme ver con optimismo mis pequeños y grandes tropiezos, y en especial por darme el regalo más grande que la vida puede entregarme.

A Laura Lozano y Katherine Garzón por su compañerismo y hermandad, por las risas, lágrimas, alegrías y angustias compartidas, por acompañarme desde mis inicios en la carrera universitaria, hasta la última etapa de ella y por la suerte de encontrarme con personas sinceras como ustedes.

A mis tutoras Jessica Alcázar y Liliana Francis Turner por su dedicación e incondicionalidad, por la confianza que depositaron en mí al acogerme en su laboratorio y por las enseñanzas que dejaron en mi vida como profesional y ser humano.

A los profesores Lina María de los Reyes y Marcos Fidel Ávila por su calidez y por compartir sus conocimientos que conformaron los pilares de mi trabajo.

Gracias a la universidad del Tolima, a la facultad de ciencias básicas y al programa de biología. En especial al grupo de modelos experimentales para las ciencias zoo humanas, a cada uno de sus integrantes porque de alguna manera realizaron sus aportes y tuve su colaboración durante la ejecución del proyecto y porque más que el apoyo académico, tengo su amistad.

Gracias a la Universidad de Antioquia por donar las células con las que se pudieron dar desarrollo al proyecto.

Esta investigación fue financiada a través de fondos de regalías “EOCYT (proyecto n° 220220516)” quienes aportaron los fondos necesarios para el desarrollo del proyecto.

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración que me brindaron, muchas personas, amigos quienes me dieron sus palabras de aliento, y a quienes me faltan nombrar pero que siempre les recordare y llevare presente, gracias por contribuir a la realización de este sueño.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
1 OBJETIVOS	16
1.1 OBJETIVOS GENERALES	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2 MARCO TEÓRICO	17
2.1 CÉLULAS MADRE	17
2.1.1 Origen de las CM	20
2.1.2 Células madre mesenquimales (CMM)	21
2.1.3 Fuentes de obtención	21
2.1.4 Células madre de cordón umbilical	22
2.1.5 Células madre de gelatina de Wharton	23
2.1.6 Aplicaciones clínicas de las CMM	25
2.1.7 Criterios de la sociedad internacional de terapia celular (ISCT) para la identificación de CMM	26
2.2 VIABILIDAD CELULAR	29
2.3 SENESCENCIA CELULAR	30
2.3.1 Características de una célula senescente	31
2.3.2 Marcadores biológicos de senescencia celular	31
2.4 ESTRÉS OXIDATIVO ASOCIADO A LA SENESCENCIA CELULAR.	33
2.4.1 ROS	34
2.5 FACTORES DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO	34
2.5.1 FGF2 (del inglés Fibroblastic growth factor-2)	35
2.5.2 Rutas de señalización celular implicadas en proliferación celular	35
2.5.3 Relación entre el FGF2 y las CMM	35
3 METODOLOGÍA	37

3.1	TIPO DE ESTUDIO	37
3.2	POBLACIÓN	37
3.3	PLAN DE TRABAJO:	38
3.4	ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO:	39
3.5	TRATAMIENTO CON FGF-2	40
3.6	DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD.	40
3.7	INMUNOFENOTIPIFICACIÓN	41
3.8	IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS SENESCENTES	44
3.9	ESTRÉS OXIDATIVO	45
3.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
4	RESULTADOS	48
4.1	VIABILIDAD DEL CULTIVO DE CM-gW TRATADO CON FGF-2 EN DOSIS DE 3,5 Y 7,5 ng, UTILIZANDO EL REACTIVO AZUL DE TRIPÁN Y DAPI.	48
4.2	INMUNOFENOTÍPIFICACION DEL CULTIVO DE CMM-gW TRATADO CON FGF-2 EN DOSIS DE 3,5 Y 7,5 ng DURANTE LOS PASAJES, 5 Y 7 UTILIZANDO LOS MARCADORES DE SUPERFICIE CD45, CD29, CD44, CD90.	55
4.3	EFEECTO DEL FGF-2 EN DOSIS DE 3,5 Y 7,5 ng SOBRE LA SENESCENCIA DE CMM-gW DURANTE LOS PASAJES, 5 Y 7 MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA B-GALACTOSIDASA.	64
4.4	ESTRÉS OXIDATIVO DE CMM-gW TRATADAS CON FGF-2 EN DOSIS DE 3,5 Y 7,5 ng DURANTE LOS PASAJES, 5 Y 7 MEDIANTE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).	69
5	DISCUSIÓN	75
6	CONCLUSIONES	84
	RECOMENDACIONES	86
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones clínicas de las CMM.....	26
Tabla 2. Factores que intervienen en la adhesión celular.....	27
Tabla 3. Perfil Fenotípico de las CMM.....	27
Tabla 4. Características de marcadores de CMM utilizados en el desarrollo de este proyecto	28
Tabla 5. Componentes del medio de Cultivo para la manutención de CMM-gW...	39
Tabla 6. Aplicación de tratamientos de FGF-2 en el cultivo de CMM-gW.....	40
Tabla 7. Anticuerpos Monoclonales Utilizados en el estudio.	43
Tabla 8. Solución de detección de enzima B-galactosidasa	44
Tabla 9. Variables utilizadas en el desarrollo del proyecto.	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de las CM .Fuente: Autor	19
Figura 2. Corte transversal del cordón umbilical y sus partes; Fuente: Adaptado de (Vico Avalos Manuel, 2009).	24
Figura 3. Morfología de una célula senescente. Adaptado de (Turinetto et al., 2016) .	31
Figura 4. Reacción de Hidrolisis de X-gal por B-galactosidasa. Fuente:(Del Nogal -Avila, 2012).....	33
Figura 5. Planteamiento del trabajo. Fuente: autor.	38
Figura 6. Imagen digitalizada del cultivo CMM-gW en 10x.....	49
Figura 7. Imagen digitalizada de CMM-gW durante cada pasaje.	49
Figura 8. Gráfico de evaluación de la viabilidad celular, utilizando Azul de tripán durante cada pasaje.	52
Figura 9. Viabilidad de Núcleos en pase 5, utilizando DAPI, Control Negativo.	53
Figura 10 Grafico de morfología nuclear, utilizando DAPI, en el pasaje 5.....	53
Figura 11. Gráfico de morfología nuclear, utilizando DAPI, en el pasaje 7.....	55
Figura 12 Imagen digitalizada de la Inmunofenotipificación celular de un cultivo de CMM-gW durante pasaje 5. CMM-gW marcadas utilizando el anticuerpo CD90.	57
Figura 13. Imagen digitalizada de la Inmunofenotipificación celular de un cultivo de CMM-gW durante pasaje 5. CMM-gW marcadas utilizando el anticuerpo CD 29.....	58
Figura 14. Imagen digitalizada de la Inmunofenotipificación celular de un cultivo de CMM-gW durante pasaje 5. CMM-gW marcadas utilizando el anticuerpo CD 44.....	59
Figura 15. Gráfico de Inmunofenotipificación celular en el cultivo de CMM-gW en pasaje 5.....	60
Figura 16. Gráfico de Inmunofenotipificación celular en el cultivo de CMM-gW en pasaje 5.....	60
Figura 17. Imagen digitalizada de la Inmunofenotipificación celular de un cultivo de CMM-gW durante pasaje 7.	62
Figura 18. Imagen digitalizada de la Inmunofenotipificación celular de un cultivo de CMM-gW durante pasaje 7. C.	63

Figura 19. Imagen digitalizada de la Inmunofenotipificación celular de un cultivo de CMM-gW durante pasaje 7.	64
Figura 20. Imagen digitalizada de un cultivo de CMM-gW marcadas con el reactivo X-gal.	66
Figura 21. Senescencia celular pasaje 5.	67
Figura 22. Senescencia celular pasaje 7.....	67
Figura 23. Gráfico de Área de Senescencia celular en el pasaje 5..	68
Figura 24. Gráfico de Área de Senescencia celular en el pasaje 7.	69
Figura 25. Imagen digitalizada de un cultivo de CMM-gW Estrés Oxidativo de CMM-gW durante pasaje 5..	71
Figura 26. Imagen digitalizada de un cultivo de CMM-gW Estrés Oxidativo de CMM-gW durante pasaje 7..	72
Figura 27. Gráfico de detección de ROS.....	73
Figura 28. Fotografías de CMM-MOr después de 7 días de aplicar una dosis de FGF-2 (40ng).....	74

RESUMEN

La capacidad de reparación de tejidos que presentan las CMM ha marcado importancia en los últimos años, en especial, CMM-gW, originadas del cordón umbilical, las cuales son una fuente útil en ingeniería de tejidos, a pesar de ser una fuente de fácil acceso, la cantidad necesaria para un trasplante exitoso es mayor a la adquirida en el aislamiento, por lo tanto se requiere de expansión a nivel in-vitro. Durante este proceso, la capacidad proliferativa de las CMM-gW se ve limitada provocando senescencia celular. Para atenuar este estado, se han propuesto diferentes factores de crecimiento entre los que se encuentra el FGF-2 el cual está presente en procesos de proliferación y migración celular, por lo tanto el objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto del FGF-2 en el cultivo de CMM-gW, mediante la adición de dosis de 3,5 y 7,5 ng al medio de cultivo desde el pasaje 3, luego se evaluó la viabilidad celular, la senescencia del cultivo y se determinó la presencia de especies reactivas de oxígeno durante los pasajes 5 y 7, igualmente se realizó inmunofenotipificación. Se obtuvo que las dosis propuestas de FGF-2 promueven la proliferación celular y atenúan procesos como la senescencia y el estrés oxidativo, se resalta la actividad proliferativa de la dosis FGF-2 7,5ng, gracias a que demostró mitigar de manera significativa la senescencia celular. En conclusión las dosis propuestas de FGF-2 en este trabajo, contribuyen a disminuir moderadamente el proceso de senescencia celular, y reducir el estrés oxidativo.

Palabras Clave: CMM-gW, FGF-2, Proliferación, Senescencia, estrés oxidativo.

ABSTRACT

The CMM has been important in recent years, due to its proliferative characteristics and its differentiation to multiple lineages in especial CMM-gW, those derived from umbilical cord, which is a source of useful neurodegenerative diseases and other disorders, additionally these cells are characterized by their multipotentiality, capacity of adhesion to plastic surfaces and expression of positive surface antigens for CMM and absence of CMH markers. However, for a transplant is necessary an expansion process, in vitro unfortunately, the cells divisions decrease and it became senescent where their functionality and proliferative capacity reduced. Different factors have been selected among these FGF-2, which is present in different cell proliferation and migration processes. White the aim to evaluate the anti-senescent effect of FGF -2, were added doses of 3.5 ng and 7.5 ng to the culture medium since passage 3, and made it through immunophenotypic characterization during passages 5 and 7. The cell viability and B-galactosidase positive cells, and were analyzed the levels of ROS in the cells. Results showed that two doses of FGF-2 facilitated cell proliferation and attenuate processes such as senescence and oxidative stress, in especial FGF-2 7.5 ng showed a better proliferative activity than other treatments. In conclusion, it was demonstrated that FGF-2 reduces the senescence levels of the CMM-gW and that the 7.5 ng dose was the one that showed the best results, the doses proposed in this project, reduce the process of cellular senescence, and reduce oxidative stress.

Keywords: CMM-gW, FGF-2, Proliferation, Senescence, Oxidative stress.

INTRODUCCIÓN

El interés en el estudio y utilización de Células Madre Mesenquimales (CMM) en terapia regenerativa, ha incrementado en los últimos años, debido a su potencial de diferenciación hacia células especializadas y sus características de auto renovación y proliferación celular (Espinoza & Aliaga, 2016). Además, las CM secretan factores paracrinos que intervienen en la angiogénesis y modulan procesos inmunes de inflamación, facilitando su uso en trasplantes (Weir et al., 2008). Dentro del parámetro establecido por la sociedad internacional de terapia celular (ISCT), las CMM se identifican por presentar adherencia a superficies plásticas, expresión de antígenos de superficie (CD73, CD90 y CD105) y ausencia de marcadores de Células Madre Hematopoyéticas (CMH) (CD34, CD45.); adicionalmente, estas células pueden diferenciarse en múltiples linajes, los principales son, adipocitos, condrocitos y osteoblastos (Dominici et al., 2006). Estas células pueden ser aisladas de Cordón Umbilical (CU), Tejido Adiposo (TA) y Médula Ósea (MO) (Socarrás-ferrer, Del Valle-Pérez, Marsan-Suarez, Sánchez Segura, & Macias-Abraham C, 2013). El recurso más empleado clínicamente hasta el momento, es la médula ósea, sin embargo, esta fuente presenta algunas limitantes, como lo son: la edad del paciente, y el bajo número de CMM (1 en 100.000 células nucleadas) por lo que se han considerado otros tejidos y órganos como recurso de CMM (Ennis, Sarugaser, Gómez, Baksh, & Davies, 2008), entre estos, el cordón umbilical, en especial la gelatina de Wharton, debido a que estas células representan una fuente poco controversial, gracias a que su origen no presenta implicaciones bioéticas, como sucede con las CMM embrionarias (Kobolak, Dinnyes, Memic, Khademhosseini, & Mobasheri, 2016; Mitsiadis, Barrandon, Rochat, Barrandon, & De Bari, 2007) y tampoco compromete al paciente en el momento de la extracción como ocurre con las CMM adultas (Flores-figueroa, Montesinos, & Mayani, 2006), por el contrario se está dando uso a un órgano considerado anteriormente como desecho biológico. Adicionalmente estas células pueden ser recolectadas después del nacimiento, almacenarse mediante crio preservación, consecutivamente descongelarse y expandirse para ser utilizadas en terapia regenerativa (Baksh, Yao, & Tuan, 2007),

también se ha reportado que las CMM-gW son similares a las CMM-MO tanto en su morfología como en su Inmunofenotipificación (Qiao et al., 2008).

Las CMM-gW se han utilizado en diversos tratamientos, como enfermedades neurodegenerativas (Cui et al., 2017), desórdenes de córnea (Ziaei, Zhang, Patel, & McGhee, 2017), reconstrucción de tejidos (L. Huang et al., 2011), trastornos renales (Park, Hwang, Hwang, Han, & Ha, 2012), entre otros, lo que señala, la versatilidad de estas células. Sin embargo, la necesidad no solo de profundizar en el potencial de las CMM-gW como regeneradoras de tejidos, sino también en aumentar su población para utilización clínica, requiere del estudio de modelos biológicos y de cultivos celulares a nivel in-vitro, tomando en cuenta, que para un trasplante satisfactorio, se requiere conseguir un número de células, mayor al obtenido en la extracción, por lo cual es necesario un proceso de ampliación del cultivo in-vitro (Eom et al., 2014; Schnitzler et al., 2016).

Desafortunadamente, el cultivo primario de estas células no crece indefinidamente y pese a que son mantenidas bajo condiciones estables simulando su nicho celular, durante el aumento de cada pase o resiembra del cultivo, disminuye la tasa de replicación de la célula, originado por el acortamiento telomérico, daño de ADN, estrés oxidativo y ausencia de producción de factores de crecimiento, que inducen a la detención del crecimiento celular en fase G0/G1 de las CMM (Sethe, Scutt, & Stolzing, 2006). Por consiguiente, se ve afectado el crecimiento, la morfología y funcionalidad de la célula, comprometiendo la viabilidad del cultivo y finalmente, su aplicación terapéutica (Ortega Rojas, 2014). A pesar de esto, se desconoce el momento preciso en el que este proceso empieza a desarrollarse en este tipo de cultivo (Lilian Chuaire-Noack, Cristian García-Morcote, 2014).

Recientemente se ha reportado que las CMM al encontrarse bajo niveles de estrés, son altamente resistentes a la apoptosis y, responden a la activación de la senescencia celular (Turinetti, Vitale, & Giachino, 2016), esta condición, es dada por un aumento en las especies reactivas de oxígeno y conduce al daño celular (Brandl, Meyer, Bechmann,

Nerlich, & Angele, 2011), este proceso se da de forma continua e inicia desde fase 1 y va aumentando progresivamente conforme la célula va duplicándose y perdiendo su potencial proliferativo. Además, se reporta que la senescencia es un resultado independiente de las fuentes de tejido del que se obtenga inicialmente (Turinetti et al., 2016) y se identifica por exhibir cambios morfológicos en la célula, que incluyen una apariencia alargada y aplanada (Choo et al., 2014), también de presentar un aumento en la actividad lisosomal y por ende una mayor producción de la enzima B-galactosidasa la cual es detectable en pH 6, característica utilizada como marcador biológico, para detectar células senescentes (Kuilman Thomas, Michaloglou Cheysiis, 2010).

Para mitigar el proceso de senescencia celular y lograr conservar el potencial de las CM, se han propuesto diferentes estrategias, una de ellas es la adición de factores de crecimiento en el medio de cultivo, dentro de estos, el FGF-2 que ha sido considerado factor esencial durante la proliferación y diferenciación en el desarrollo embrionario (Hidaka, Nagasawa, Shirai, Kado, & Furuichi, 2012; Kottakis et al., 2011), también ha sido postulado como promotor de la auto renovación celular manteniendo la proliferación del cultivo in-vitro y más recientemente se ha reportado como un supresor de la senescencia in vitro (Ito, Sawada, Fujiwara, Seyama, & Tsuchiya, 2007).

En este sentido, es necesario evaluar el efecto del FGF-2 y su capacidad para activar procesos de proliferación celular sin promover aquellos de diferenciación, mediante la caracterización inmunofenotípica de éstas, para así contribuir en estudios posteriores de terapia regenerativa ampliando información de este campo que se ha ido forjado en Colombia y el Tolima

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVOS GENERALES

Evaluar el efecto anti senescente del FGF-2 mediante la caracterización inmunofenotípica de un cultivo de CMM-gW

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un modelo de cultivo de CMM-gW y determinar su viabilidad con el tratamiento con FGF-2 en dosis de 3,5 y 7,5 ng, durante los pasajes 5 y 7 de cultivo.
- Inmunofenotipificar un cultivo de CMM-gW tratado con FGF-2 en dosis de 3,5 y 7,5 ng durante los pasajes, 5 y 7 utilizando los marcadores de superficie CD45, CD29, CD44, CD90.
- Determinar la senescencia y el estrés oxidativo de CMM-gW tratado con FGF-2 en dosis de 3,5 y 7,5 ng durante los pasajes, 5 y 7 mediante la producción de la enzima B-galactosidasa y la detección de especies reactivas de oxígeno.
- Correlacionar los resultados de senescencia, estrés oxidativo e inmunofenotipificación de CMM-gW

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CÉLULAS MADRE

Son un grupo de células indiferenciadas que poseen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse hacia múltiples linajes, desempeñando funciones especializadas en el organismo (Kobolak et al., 2016).

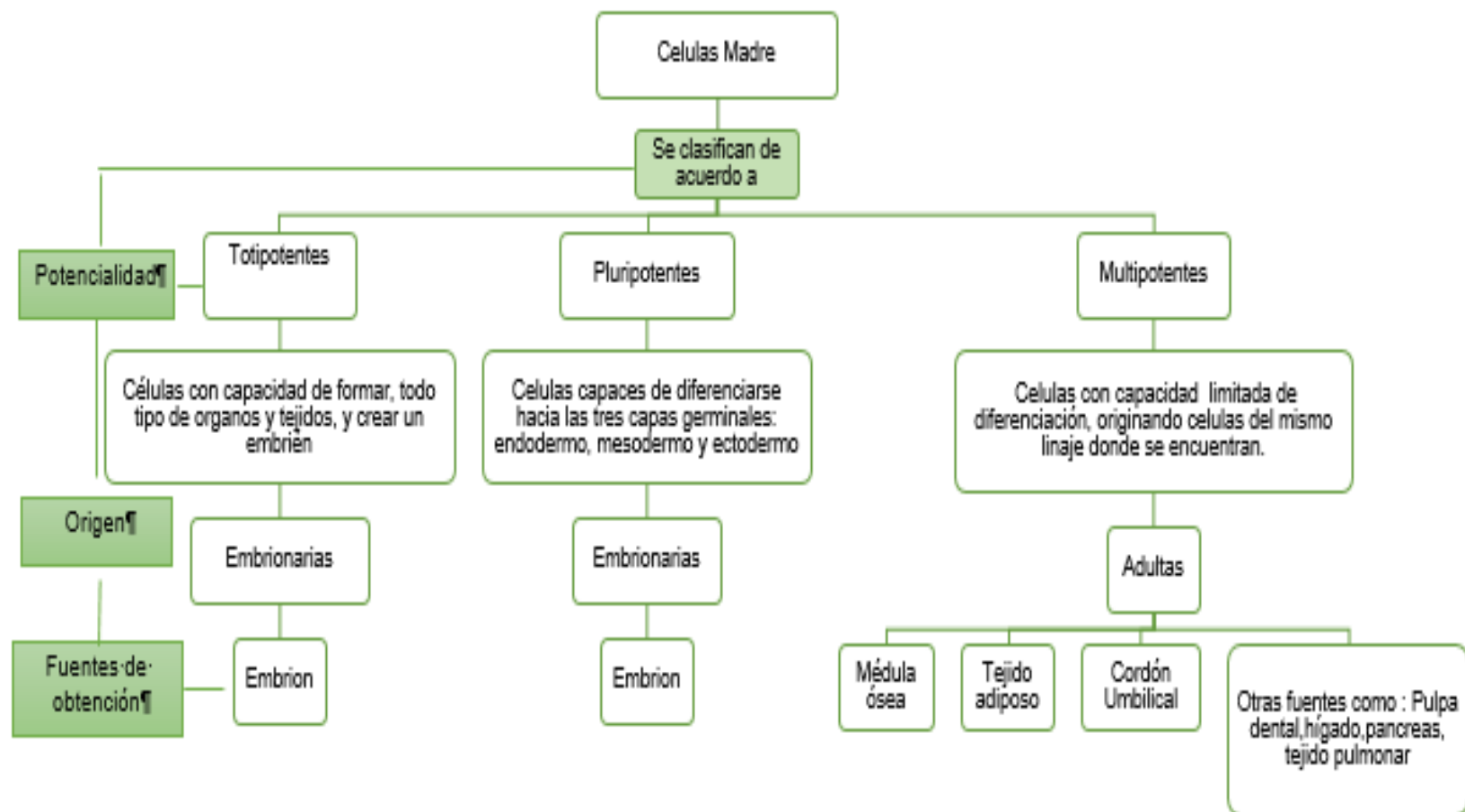
En 1960 el término CM fue descrito por primera vez por *Friednestein*, refiriéndose a células de médula ósea adherentes en cultivo (Espinoza & Aliaga, 2016). En 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT por sus siglas en inglés) propuso parámetros para la identificación de células madre, como: expresión de antígenos de superficie (CD73 CD90 Y CD105) y ausencia de marcadores para células madre hematopoyéticas (CMH), (CD34, CD45.), además de poder diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos (Dominici et al., 2006; Fuentes Lacouture, 2008).

Las CM pueden clasificarse según su potencial de diferenciación (que se refiere a la capacidad que tienen de generar otro tipo celular) en, totipotentes, pluripotentes y Multipotentes (Wurzer, 2012), las células totipotentes, obtenidas en las primeras divisiones del cigoto, pueden generar un organismo completo, debido a su capacidad de formar células y estructuras embrionarias y extraembrionarias como la placenta, las células pluripotentes pueden generar cualquier tipo celular del organismo adulto y dan inicio a células de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo. Por el contrario las Multipotentes, solo son capaces de originar células del mismo linaje embrionario de donde fueron originadas, se encuentran en tejidos adultos autorrenovables y cumplen un rol fundamental en el mantenimiento y reparación de tejidos en el organismo durante toda la vida .(Araos Graterol, 2009), (Figura 1).

De acuerdo con la fase de desarrollo en la que se encuentran las CM se pueden clasificar en: embrionarias y adultas (Kolf, Cho, & Tuan, 2007; Zhao, Ren, & Han, 2015). Las CM

embrionarias, son consideradas células pluripotentes, debido a que son originadas de células del blastocisto, es decir estas células tienen la capacidad de producir cualquier tipo celular ya sea embrionario o extraembrionario (Lakshmipathy & Verfaillie, 2005; María, 2012), mientras que las CM adultas, al ser derivadas del mesodermo fetal, son consideradas células multipotentes, es decir que sus capacidades de diferenciación se ven restringidas, dando lugar a células especializadas del linaje donde se encuentren situadas, por lo tanto, su potencial se ve dirigido hacia una única capa embrionaria es decir a tejidos derivados ya sea del mesodermo, endodermo o ectodermo (Bydlowski, Debes, Maselli, & Janz, 2009).

Figura 1. Clasificación de las CM



Fuente: Autor

Origen de las CM. Las CM son células indiferenciadas que pueden generar tejidos especializados (Kobolak et al., 2016), de acuerdo con su origen, las CM se clasifican en: CM embrionarias, CM fetales y CM adultas

1.1.1.1 CM Embrionarias. Son formadas durante la pre-implantación del embrión, se obtienen a partir de la masa celular interna del blastocisto y presentan pluripotencia es decir que tienen la capacidad de proliferar de forma continua sin diferenciarse, asimismo pueden dar origen a cualquier tejido del organismo sin importar la capa embrionaria. Sin embargo su utilización se ve restringida (Prósper et al., 2006) debido a que estas al diferenciarse, pierden potencial (Araos Graterol, 2009) y su característica proliferativa, lleva a la producción de tumores (fundamentalmente teratomas) que son detectados de forma invariable (Prósper et al., 2006).

1.1.1.2 CM Fetales. Son células Multipotentes, se encuentran en tejidos extraembrionarios de apoyo al feto, como lo son: Líquido amniótico, cordón umbilical y placenta (Kobolak et al., 2016; Ziaei et al., 2017), al igual que las CM adultas, en los tejidos fetales se encuentran CMH Y CMM (Andrea et al., 2007)

1.1.1.3 CM Adultas. Son células originadas del mesodermo fetal, con capacidad de auto renovarse y proliferar, su capacidad de diferenciarse se ve limitada dependiendo del tejido del que fueron obtenidas, especialmente en función del origen embrionario, por lo cual son consideradas Multipotentes (Prósper et al., 2006).

Estas CM pueden ser aisladas de algunos órganos como: páncreas, hígado tejido pulmonar, pulpa dental, médula ósea y tejido adiposo (Guerrero, Romero, Marcela, & Pardo, 2007; María, 2012). Estas células se clasifican en CM mesenquimales (CMM) y CM hematopoyéticas (CMH), las CMH, dan origen a células de linaje sanguíneo. Mientras que las CMM dan origen a tejidos del mesodermo, como: músculos, cartílago, huesos y dermis.(Kobolak et al., 2016).

. Células madre mesenquimales (CMM). Las CMM o también llamadas células troncales son un grupo de células indiferenciadas, responsables de formación y regeneración de tejidos, con capacidad de proliferar y diferenciarse en múltiples linajes. Fueron identificadas en 1966, por Friedenstein y colaboradores, quienes desarrollaron por primera vez cultivos *in vitro* de estas, permitiendo aislar y evaluar su potencial de diferenciación y las describieron como células con morfología fibroblastoide y capacidad adherente (Baker, Boyette, & Tuan, 2015; Bydlowski et al., 2009; Kolf et al., 2007; Pountos, Corscadden, Emery, & Giannoudis, 2007; Zhao et al., 2015). Las CMM se han convertido en candidatas para terapias regenerativas, debido a su capacidad de formar colonias y diferenciarse a otros tipos celulares tanto *in vitro* como *in vivo*, adicionalmente presentan baja inmunidad siendo adecuadas para trasplantes alogénicos. La expansión de CMM es un factor importante en el uso clínico, debido a que el número de células necesario para estos tratamientos es superior al que se puede obtener directamente de una biopsia de tejido (da Silva Meirelles, Chagastelles, & Nardi, 2006; Hernández-ramírez & Forrellat-barrios, 2013; Macías-Abraham, Del Valle-Pérez, Hernández-Ramírez, & Ballester-Santovenia, 2010; Mafi, Mafi, Hindocha, & Khan, 2011).

Fuentes de obtención. Las CMM pueden ser obtenidas de diferentes fuentes (figura 1), sus principales son: Médula ósea (López, 2015), Tejido adiposo (Carvalho et al., 2013) y cordón umbilical (Zhang et al., 2011). Se pueden encontrar en menor proporción en algunos órganos como el páncreas, hígado, tejido pulmonar (García, 2015) y pulpa dental (Brizuela, 2013).

Las CM fueron encontradas inicialmente en la Médula Ósea (MO), donde proveen soporte estructural y funcional para el proceso de la hematopoyesis, sin embargo, a pesar de que esta es la principal fuente de aislamiento presenta restricciones como: bajo número de CMM, un procedimiento peligroso en el momento de la toma de muestra y una disminución en la capacidad proliferativa dependiendo de la edad del donante (Fuentes Lacouture, 2008; Guerrero et al., 2007; Weir et al., 2008).

Las CMM son aisladas también de tejido adiposo (TA), y presentan una morfología y fenotipo similar a las CMM obtenidas de MO. En el año 2001 fueron descritas como un grupo de células con aspecto fibroblastoide y capacidad de adhesión al plástico, por Hedrick, quien analizó su fenotipo celular y las nombró PLA del inglés (Processed Lipoaspirated Cells) (María, 2012), a pesar de que la obtención de estas células tiene una mayor facilidad (Guerrero et al., 2007), su capacidad de crecimiento in-vitro es limitada y la actividad metabólica del tejido adiposo depende de su localización, la edad y el sexo del donante (María, 2012).

Las limitaciones que representan la obtención de CMM, tanto adultas como embrionarias, han postulado una nueva fuente de obtención, donde su extracción no comprometa al donante y su utilización no produzca reacciones inmunológicas (Araos Graterol, 2009), postulando al cordón umbilical, el cual posee CMM al igual que el TA y la MO con capacidad de autor renovarse. El interés por el estudio de esta nueva fuente, ha llevado al desarrollo de investigaciones en CMM, para su uso en terapias celulares aplicadas a seres humanos, y se estará potencializando el uso de un órgano que era considerado anteriormente como material de desecho (Vico Avalos Manuel, 2009).

Células madre mesenquimales presentes en cordón umbilical. El cordón umbilical representa un vínculo directo entre la madre y el feto durante el embarazo, este se origina de la matriz extraembrionaria durante los 26 primeros días de gestación, este órgano fue descrito por Thomas Wharton en 1956, y se encuentra formado por dos arterias y una vena, rodeadas de tejido mucoide (Araos Graterol, 2009; Sarugaser, Lickorish, Baksh, Hosseini, & Davies, 2005).

En el cordón umbilical, se encuentran diferentes tipos celulares como lo son amnioblastos, los cuales recubre el cordón umbilical, y CMM; las cuales se clasifican en células madre de sangre periférica (SCU) y células madre que se encuentran alrededor del cordón, derivadas del epitelio de la membrana amniótica, conocidas como células de la gelatina de Wharton (CM-gW) (Jaimes-Parra, 2014; Lodi, Daniele; Iannitti Tommaso; Palmieri, 2011; Vico Avalos Manuel, 2009);

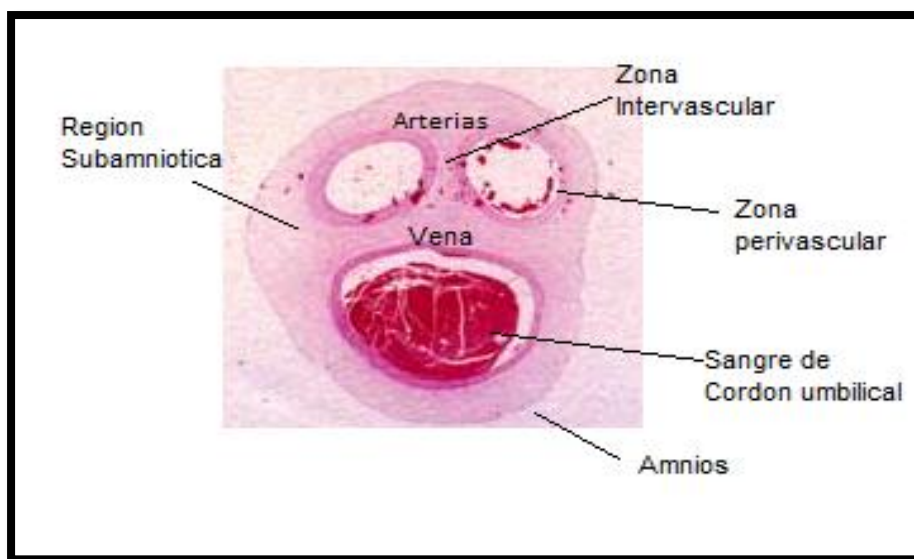
Estas últimas, poseen características de ambos tipos celulares, tanto embrionarias como adultas (Liu et al., 2016) y al igual que las CM encontradas en MO presentan marcadores específicos para CMM como lo son la expresión de moléculas de adhesión (CD44 y CD105), marcadores de integrinas (CD29 y CD51) y no expresan marcadores de diferenciación hematopoyético (CD34 y CD45) (Araos Graterol, 2009).

Al contrario de la CM embrionarias, el cordón umbilical no presenta implicaciones éticas y religiosas, su potencial de diferenciación se encuentra en un nivel intermedio entre las CM embrionarias y las CM adultas, sin embargo al igual que las CM adultas su capacidad proliferativa es limitada (Mohammadi et al., 2018).

Células madre de gelatina de Wharton. Estas Células son originadas de la matriz extraembrionaria del cordón umbilical, presentan características de auto renovación y se pueden diferenciar a otros tipos celulares, dependiendo de su localización su potencial proliferativo puede aumentar o disminuir (Jaimes-Parra, 2014; Liu et al., 2016; Vico Avalos Manuel, 2009) (figura 2), estos son:

- CM perivasculares
- CM zona intervascular
- CM región subamniótica

Figura 2. Corte transversal del cordón umbilical y sus partes



Fuente: Adaptado de (Vico Avalos Manuel, 2009)

En 2005, Sarugaser y col. reportan en un cultivo de CMM-gW, una morfología homogénea a lo largo de 9 pasajes o subcultivos, durante los cuales el tiempo de duplicación celular disminuye desde el pase 2 al 6 (Sarugaser et al., 2005). Las CM-gW que se utilizaron para el desarrollo de este proyecto pertenecen a la zona perivascular, intravascular y subamniótica.

Dentro de las ventajas que posee la utilización de estas células en terapia regenerativa se encuentran: su potencia de autorrenovación, diferenciación y proliferación, esta zona también contiene un mayor número de CMM (aproximado de 400.000) en comparación con las CMM de médula ósea, cabe resaltar que la obtención de estas células (Ziaei et al., 2017), se realiza de manera fácil sin causar inconvenientes al donante (Drela et al., 2014).

Sin embargo, la desventaja que presenta las CMM-gW continua siendo su cantidad, pues su número es insuficiente para un trasplante satisfactorio en adultos y generalmente se usan más de dos cordones umbilicales por paciente (García, 2015).

Aplicaciones clínicas de las CMM. Las investigaciones en Biología y la utilización de las CMM han aumentado en la última década, gracias a su potencial regenerativo y la capacidad que tienen de diferenciarse hacia diferentes tejidos (Cui et al., 2017). Para un trasplante satisfactorio, las CMM presentan algunas ventajas de acuerdo con sus propiedades biológicas:

- 1- La ampliación del cultivo, se realiza de manera eficaz en CMM y se logra alcanzar un número de células mayor al obtenido en la extracción; en comparación con las CM de origen embrionario, su potencial tumorigénico es bajo (Espinoza & Aliaga, 2016)
- 2- Sus propiedades inmunomoduladoras logran suprimir respuestas asociadas a procesos inflamatorios (Apel et al., 2009).
- 3- Las CMM median procesos de reparación tisular (Tobin & Sc, 2012)

Las CMM se han utilizado en varios estudios, demostrando su potencial de regeneración tisular, en una búsqueda del banco de datos del Instituto nacional de salud de Estados Unidos (<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=umbilical+cord+Mesenchymal+stem+cell>) Utilizando el término Umbilical Cord Mesenchymal stem cell, el 15-02-2018 se encontraron 161 estudios clínicos al respecto, donde se realizan estudios desde su trasplante para enfermedades pulmonares y diabetes (Can, Celikkan, & Cinar, 2017) reconstrucción del epitelio corneal (Ziaei et al., 2017), tratamientos en alzhéimer (X. Wang et al., 2018), además las CMM pueden mediar enfermedades inmunes (Donnelly et al., 2014).

En la siguiente tabla se establece los campos más utilizados en la actualidad, y las diferentes enfermedades tratadas (tabla1).

Tabla 1.Aplicaciones clínicas de las CMM.

Campo de acción	Enfermedades
Cardiología	Infarto de Miocardio
Ortopedia	Fracturas óseas, osteogénesis imperfecta, Quistes Óseos
Neurología	Parkinson, Alzheimer
Oftalmología	Degeneración corneal,
Dermatología	Quemaduras
Inflamatorias	Artritis reumatoide
Psicología Clínica	Autismo

Fuente: Tomado y ajustado de Socarras-Ferrer et al (2013).

A pesar de los avances en la caracterización fenotípica, ontogénica y funcional de las CMM, aún siguen existiendo vacíos, que nos incentivan a investigar aún más el potencial de las CMM como regeneradoras de tejidos y así aumentar su población para una eficiente utilización de estas en medicina regenerativa.

Criterios de la sociedad internacional de terapia celular (ISCT) para la identificación de CMM. La ISCT ha propuesto tres criterios principales para la identificación de CM estos son:

1.1.1.4 Adherencia al plástico.A diferencia de las CMH las CMM presentan selectividad por algunos materiales dependiendo de las proteínas de membrana que poseen, tales como: Integrinas, receptores de factores de crecimiento, y moléculas de matriz (Fuentes Lacouture, 2008). Este proceso es dinámico y depende de la interacción de proteínas de superficie celular con el material donde se encuentra el cultivo, además de la composición iónica, el pH, la fase de contacto de las células en la cual intervienen.

Tabla 2. Factores que intervienen en la adhesión celular.

Evento	Factores que intervienen
Adhesión de proteínas	pH, composición iónica, temperatura
Adhesión celular	Proteínas del citoesqueleto, matriz y membrana celular
Extensión celular	Proteínas del citoesqueleto matriz y membrana celular

Fuente:(Guerrero et al., 2007)

1.1.1.5 Inmunofenotipo. Los marcadores de Fenotipo son una herramienta fundamental para la identificación de CM que a su vez permiten diferenciarlas de otras células que presentan adherencia al plástico (Parekkadan & Milwid, 2010), algunos de los marcadores más utilizados para la identificación de CMM se encuentran en la siguiente tabla, y presentan la sigla CD proveniente del inglés (*clúster of differentiation*) que significa: grupos de diferenciación

Tabla 3. Perfil Fenotípico de las CMM

Grupo	Marcador	Proteína expresada	Detección
Receptores Hematopoyéticos	CD34	Progenitores Hematopoyéticos	Negativa
	CD45	Marcador de leucocitos	Negativa
Moléculas de adhesión	CD44	HCAM	Positivo
	CD50	ICAM-3	Positivo
	CD54	ICAM-1	Positivo
	CD56	NCAM	Positivo
	CD58	LFA-3	Positivo
	CD106	VCAM	Positivo
	CD102	ICAM-2	Positivo
	CD62L	L-Selectina	Positivo

Fuente: Adaptado de (Pountos et al., 2007).

Integrinas	CD29	VLA- β	Positivo
	CD49a	VLA- α 1	Positivo
	CD49b	VLA- α 2	Positivo
	CD104	B-Integrina	Positivo
Factores de crecimiento y citoquinas	CD25		Negativo
	CD71	Receptor transferrina	Positivo
	CD121	IL-1 R	Positivo
	CD123	IL-3 4	Positivo
	CD124	IL-4 R	Positivo
	CD126	IL-6 R	Positivo
	CD127	IL-7 R	Positivo
Marcador específico para CMM	CD73	5'nucleotidasa	Positivo
	CD90	Thy-1	Positivo
	CD105	Endoglina	Positivo
	CD146	MUC-18	Positivo
	CD157	BST-1	Positivo

En el siguiente proyecto se analizarán los siguientes marcadores:

Tabla 4. Características de marcadores de CMM utilizados en el desarrollo de este proyecto

Marcador	Características
CD44	Es una proteína transmembranal de adhesión, posee alta afinidad a moléculas como el ácido hialuronico e interactúa con otros ligando como el colágeno, fibronectina y metaloproteinasas. Presenta un peso molecular de 37kD y está conformado por 341 aminoácidos (Guerrero et al., 2007). CD44 tiene diversos ligandos, que varían dependiendo del tipo de tejido, entre estos se encuentran, el hialuronato, el condroitin-sulfato, heparán sulfato, colágeno y laminina (Castellà Fernández, 2005).

Marcador	Características
CD29	Esta proteína, también conocida como Integrina beta-1 presenta un dominio citoplasmático unido al citoesqueleto de actina, Los miembros de este grupo, son receptores de membrana implicados en la adhesión celular y en procesos como la reparación de tejidos, y respuesta inmune de CMM.(Marín, 2002).
CD90	Es una proteína perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas, presenta un peso molecular de 25-35 KDa y está conformada por 112 aminoácidos (Guerrero et al., 2007). Esta molécula también conocida como Thy-1 se encuentra en la superficie celular, anclada por medio de un glicofosfatidilinositol (Guerrero et al., 2007).
CD45	Es un Antígeno leucocitario, pertenece al grupo de proteínas tirosina fosfatasa (PTP) y se encuentra localizada en células Hematopoyéticas (Scadden, 2006).

Fuente: Autor

1.1.1.6 Capacidad de diferenciarse. Las CMM se ven reguladas por diferentes señales externas que comprometen su nivel de diferenciación, estudios realizados demuestran su capacidad de generar un trilineaje, (adipogénico, osteogénico y condrogénico). Sin embargo mediante estrategias de diferenciación in-vitro, las CMM ya diferenciadas en estos tres linajes, pueden cambiar sus fenotipos en respuesta a estímulos específicos extracelulares, adicionados en el medio de cultivo (Guerrero et al., 2007).

La diferenciación hacia estos linajes se puede demostrar mediante tinción con rojo de alizarina para osteoblastos, la de adipocitos con Oil- Red y la de condroblasto con tinción de colágeno tipo II (Dominici et al., 2006).

2.2 VIABILIDAD CELULAR

La determinación de la viabilidad de las células mantenidas en cultivo, es un requisito importante para la utilización de estas en terapia regenerativa e ingeniería de tejidos (Tower, 2012). La evaluación de integridad de membrana, es una de las técnicas más utilizadas para evaluar la viabilidad y funcionalidad celular, este método actúa bajo ensayos de inclusión y exclusión, donde el azul de tripán tiñe la membrana celular de las células no viables (de Mattos Carvalho et al., 2009). En este proyecto para determinar la viabilidad celular se tendrá en cuenta, el protocolo de azul de tripán y para evaluar la integridad del núcleo se utilizara DAPI, el cual es un colorante, que emite una fluorescencia Azul cuando se une al ADN.

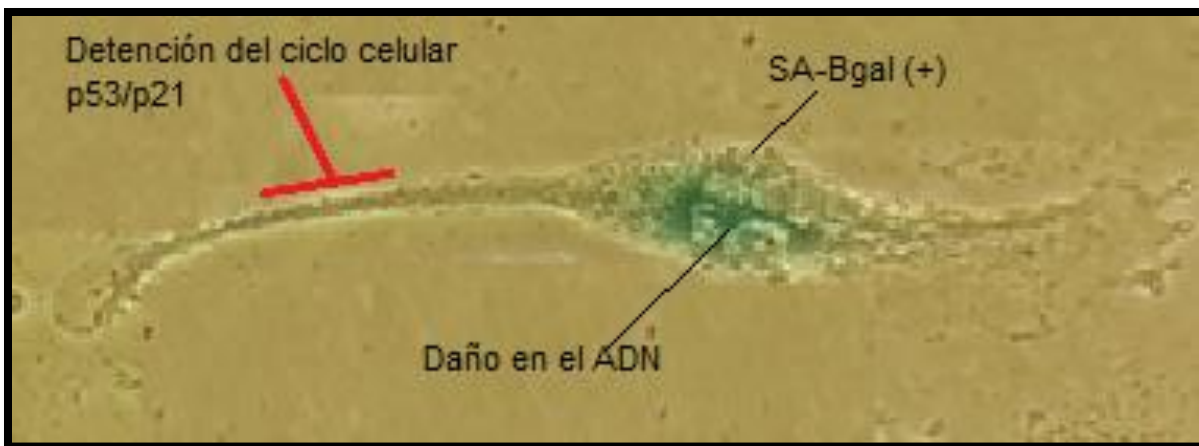
2.3 SENESENCIA CELULAR

Durante el proceso de expansión in-vitro, la capacidad proliferativa del cultivo disminuye progresivamente, después de cierto número de divisiones, esta etapa es considerada como senescencia replicativa y fue descrita por primera vez por Hayflick en 1961 (Souza, 2011), donde las células presentan cambios en su morfología y funcionalidad, estos cambios se ven directamente asociados con la ausencia de la enzima telomerasa y la producción de radicales libres (Lerma Hernandez, 2012), inducidos por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (del inglés Reactive Oxygen Species), errores en la replicación y radiación UV (Cortes Tique, 2011).

De esta manera, las CMM, entran en arresto del ciclo celular, presentando cambios en su morfología y funcionalidad (Carpes et al., 2009; Lee, 2012; Meng et al., 2017). Diferentes investigaciones, sugieren que las células entran en senescencia a través de las vías de activación p53 y p16, ambas vías se relacionan en la actividad de la proteína Retinoblastoma (RB), esta proteína actúa bloqueando la fase G1 del ciclo celular, impidiendo la activación del factor E2F implicado en la replicación del ADN (Turinetti et al., 2016), sin embargo a pesar de que se conocen las vías metabólicas que llevan a este estado, aún no se tiene claridad del momento en el que este proceso inicia, y se desconocen los mecanismos que pueden regularlo.

2.3.1 Características de una célula senescente. Las células senescentes, se caracterizan por presentar detención del ciclo celular en fase G1, aunque siguen siendo metabólicamente activas, no consiguen proliferar debido a la expresión de inhibidores del ciclo celular, por consiguiente son resistentes al proceso de apoptosis o muerte celular controlada, investigaciones sugieren, que las células senescentes presentan una regulación post-traducciona de la proteína p53 la cual impide la activación de vías que inducen apoptosis (Dolivo, Hernández, & Dominko, 2016). Otra característica propia de una célula senescente son los cambios en su morfología, siendo reconocidas por un aumento de tamaño y una apariencia plana, con presencia de granularidades de desechos celulares (figura. 2) (Vidal, Walker, Napoli, & Borjesson, 2012) y la presencia de la enzima B-galactosidasa (Del Nogal -Avila, 2012).

Figura 3. Morfología de una célula senescente



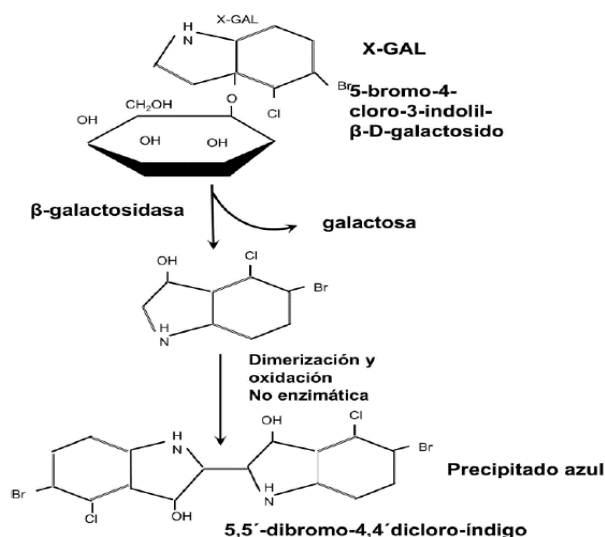
Fuente: Adaptado de (Turinetto et al., 2016)

2.3.2 Marcadores biológicos de senescencia celular. Diferentes Marcadores se han estudiado y propuesto para la identificación de células senescentes, tales como, la identificación de telómeros relacionados con el acortamiento telomérico, asociado a la replicación, sin embargo esta es una característica propia de envejecimiento, también relacionada, con enfermedades cardiovasculares, además se tiene poco conocimiento de los umbrales de los telómeros cortos (Kuilman Thomas, Michaloglou Cheysiis, 2010),

otro marcador que se ha propuesto para la identificación de células senescentes son los focos de heterocromatina asociados a la senescencia (del inglés Senescence associated heterochromatin focus, SAHF), debido a que se ha evidenciado que las células en estado senescente, no podrían volver a un estado cíclico, dado por la condensación de la cromatina, estos focos pueden ser caracterizados con DAPI y se pueden visualizar en el microscopio, sin embargo, este marcador debe ser corroborado con algún otro, puesto que las células pueden acumular regiones dañadas de ADN por otros factores diferentes a la senescencia, como la incapacidad de reparar lesiones en el genoma (de Jesus & Blasco, 2012; Feng, 2012). Otro marcador, hasta el momento el más utilizado en la detección de células senescentes, es la B-galactosidasa, debido a que se ha demostrado, que solamente se encuentra presente en estas células y no en fibroblastos o queratinocitos pre senescentes o quiescentes (de Jesus & Blasco, 2012), lo que indica que es un marcador confiable.

Aunque se desconoce la función de la B-galactosidasa, esta enzima ha sido utilizada como marcador de senescencia celular expresándose del 25-55% en las células senescentes (Lilian Chuaire-Noack, Cristian García-Morcote, 2014). Por lo tanto, a nivel in vitro se puede detectar la expresión de esta enzima, la cual se encuentra en los lisosomas, y en especial en las células senescentes tiene un incremento del pH de 4 a 6 (Chuaire-Noack, García-Morcote, & Ramírez-Clavijo, 2011). La enzima B-galactosidasa pertenece al grupo de las hidrolasas, y está encargada de catalizar la hidrólisis de enlaces β -galactósidos de la lactosa en monosacáridos galactosa y glucosa. Su localización es en los lisosomas y trabaja a un pH óptimo de 4.0-4.5, sin embargo como se mencionaba anteriormente, en células senescentes el pH incrementa a 6 (fig. 3) (Del Nogal -Avila, 2012), este ensayo fue descrito descrita en 1995 (Dimri et al., 1995), donde las células positivas para SA- β gal se tiñen de azul, producto de la degradación del sustrato X gal (Cortes Tique, 2011; Lerma Hernandez, 2012).

Figura 4. Reacción de Hidrolisis de X-gal por B-galactosidasa.



Fuente:(Del Nogal -Avila, 2012).

2.4 ESTRÉS OXIDATIVO ASOCIADO A LA SENESCENCIA CELULAR.

A pesar del potencial proliferativo y de auto renovación que poseen las CM, durante el proceso de expansión in vitro, se ven afectadas por estrés oxidativo, resultando un exceso de ROS, como: Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^\cdot) y anión su peróxido (O_2^-) (Liu et al., 2016), comprometiendo la funcionalidad de las CMM.

El estrés oxidativo es una condición dada en las células por la acumulación de ROS, los altos niveles de estas moléculas inducen a la oxidación de lípidos, proteínas y ADN, dando lugar a daño celular, este estado se incrementa en el proceso de auto renovación y diferenciación celular (Brandl et al., 2011; Machado et al., 2015).

Las especies reactivas de oxígeno son liberadas de forma continua en consecuencia del metabolismo mitocondrial, acelerando el acortamiento de los telómeros, además de daños producidos en el ADN induciendo la producción de la proteína p53 y a su vez a la detención del ciclo y muerte celular (Benito de las Heras, 2003). Los radicales libres son definidos como “especies que contienen uno o más electrones desapareado, altamente reactivos e inestables” mientras que el término ROS se refiere a la variedad de moléculas

reactivas derivadas de oxígeno y que pueden ser radicales libres, radical hidroxilo o no radical libre (Denu & Hematti, 2016; Tovar Fernandez, 2013).

El exceso de ROS interactúa con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Tovar Fernández, 2013), efectos que junto con el largo tiempo del cultivo comprometen el potencial de las CMM resultando en el daño oxidativo de estas y por consiguiente en la detención del ciclo celular y pérdida de la proliferación dando lugar al estado de senescencia (Liu et al., 2016).

2.4.1 ROS. Son subproductos del metabolismo normal del oxígeno, del complejo I (NADH deshidrogenasa ubiquinona-ubiquinol) y complejo III (ubiquinol citocromo c reductasa). Los niveles bajos de ROS juegan un rol importante en vías de señalización celular, sin embargo, cuando la producción de estas especies aumenta, puede inducir daño molecular conduciendo a la detención del ciclo celular o a una muerte celular (Lu & Zhao, 2012).

2.5 FACTORES DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICOS

Son un conjunto de moléculas protéicas y péptidos bioreguladores que intervienen en el desarrollo de diferentes tejidos, estas moléculas están compuestas por un grupo de 22 miembros identificados en vertebrados e invertebrados los cuales varían en peso molecular de 17 a 34 kD (Agnieszka Dudka, 2009).

La clasificación de los FGFs depende de su funcionalidad y el mecanismo de acción, entre los cuales se encuentran los FGFs de señalización paracrina (FGF2, FGF4, FGF 7, FGF 9 y FGF 8), endocrina (FGF15 / 19 , FGF 21 y FGF 23) e intracrina (FGF11- FGF14), cada uno de estos está implicado en aspectos de desarrollo celular que incluyen, la proliferación, crecimiento y diferenciación; además de actuar sobre diferentes tipos celulares con el fin de regular funciones fisiológicas como la angiogénesis, crecimiento celular, desarrollo embrionario, regulación metabólica, migración celular y reparación de tejidos (Markan & Potthoff, 2015; Rodrigues, Griffith, & Wells, 2010).

2.5.1 FGF2 (del inglés Fibroblastic growth factor-2). Es un miembro de la familia de polipéptidos del inglés Fibroblastic, growth factor (FGF), está implicado en el desarrollo embrionario y la homeostasis del tejido adulto y es importante en el mantenimiento de funciones de reparación y regeneración de tejidos, diferentes estudios manifiestan la capacidad del FGF-2 en sostener la proliferación de CM, manteniendo su fenotipo y la población celular a largo plazo, otros estudios afirman que los efectos de FGF2 en CMM se han estudiado ampliamente, mostrando una mejora en la proliferación y el potencial condrogénico cuando se aplica durante la quinta fase de expansión celular, este factor también se ha evidenciado que estimula la proliferación endotelial (Kabiri et al., 2012; Roobrouck, Ulloa-montoya, & Verfaillie, 2008; Yeoh & de Haan, 2007)

2.5.2 Rutas de señalización celular implicadas en proliferación celular. Los FGF realizan su acción proliferativa mediante la activación de diferentes vías de señalización celular. Estos pueden tener interacciones directas con receptores específicos de membrana (FGF-R) o con otras proteínas celulares ligadas a receptores Heparán sulfato proteoglicanos (HSPG), activando receptores tirosina quinasa y desplegando cascadas de señalización de la vía RAS (Fernandes-freitas & Owen, 2015; Naugler et al., 2015).

EL FGF-2 presentan diferentes *señalización paracrina* y se encarga de realizar enlaces de alta afinidad con receptores HSPG, que sirven como cofactores para la interacción con los FGFR (1-4), (Coutu & Galipeau, 2011) estos a su vez activan cascadas de señalización como lo son RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT y PLC γ , con el fin de cumplir un papel fundamental en el desarrollo de órganos como el corazón, cerebro, músculo y riñones (Bellusci, 2015). Este efecto es demostrado por Coutou (2017) quien sugirió que el FGF-2 regula la senescencia a través de los receptores FGFR1/2. Apoyado por Norwa et al (2017) quienes reportaron que este factor promueve la proliferación celular mediante la activación de la vía PI3K/AKT, manteniendo el cultivo celular con sus características de auto renovación.

2.5.3 Relación entre el FGF2 y las CMM. Las CMM tienen capacidades de renovación celular y plasticidad fenotípica, sin embargo debido al alto número de células que se

requiere en terapia clínica, el cultivo celular necesita ser expandido a nivel in-vitro, donde tras varios pases celulares las CMM pierden sus características morfológicas y funcionales llegando a la senescencia celular (Feng, 2012).

El rol del FGF-2 Como mitigante de este proceso, manteniendo además de una forma inmadura las CMM, sin diferenciarlas, hace que este factor sea fundamental en el enriquecimiento del cultivo In-vitro (Ito, Sawada, Fujiwara, Seyama, & Tsuchiya, 2007). Diferentes autores han reportado, que la adición de FGF, promueve proliferación celular Bianchi et al., (2003) evidenció, que el enriquecimiento de un cultivo celular con 1 ng de FGF-2, logró incrementar gradualmente la formación de telómeros, efecto adverso a lo que ocurre normalmente en la senescencia a nivel in vitro y en el envejecimiento in vivo, donde los telómeros se van acortando debido a la replicación unidireccional de las ADN polimerasas, otro estudio, realizado por Zheng, Nowakowski, & Vaccarino, (2004) evaluó la capacidad de este mismo factor (FGF-2) en la manutención de células madre de precursor neural encontradas en la zona sub ventricular del cerebro de ratón, determinando que este factor contribuye no solo a la proliferación neural, sino que también a la astrogial y a la inducción de progenitores oligodendrogiales (Zheng et al., 2004). Por otro lado, Wang et al (2015) aislaron células madre de médula ósea del panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) e investigaron el potencial de proliferación y diferenciación de estas células a nivel in vitro en adición del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), el cual ha demostrado desempeñar un papel fundamental en el mantenimiento y diferenciación celular y aumento de la longitud telomérica.

De esta manera, en el siguiente proyecto se analizará el rol que cumple el FGF-2 en CMM-gW, donde no se ha comprobado sus efectos anteriormente, además se probarán dos dosis distintas a las anteriormente ya propuestas.

3. METODOLOGÍA

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Descriptivo

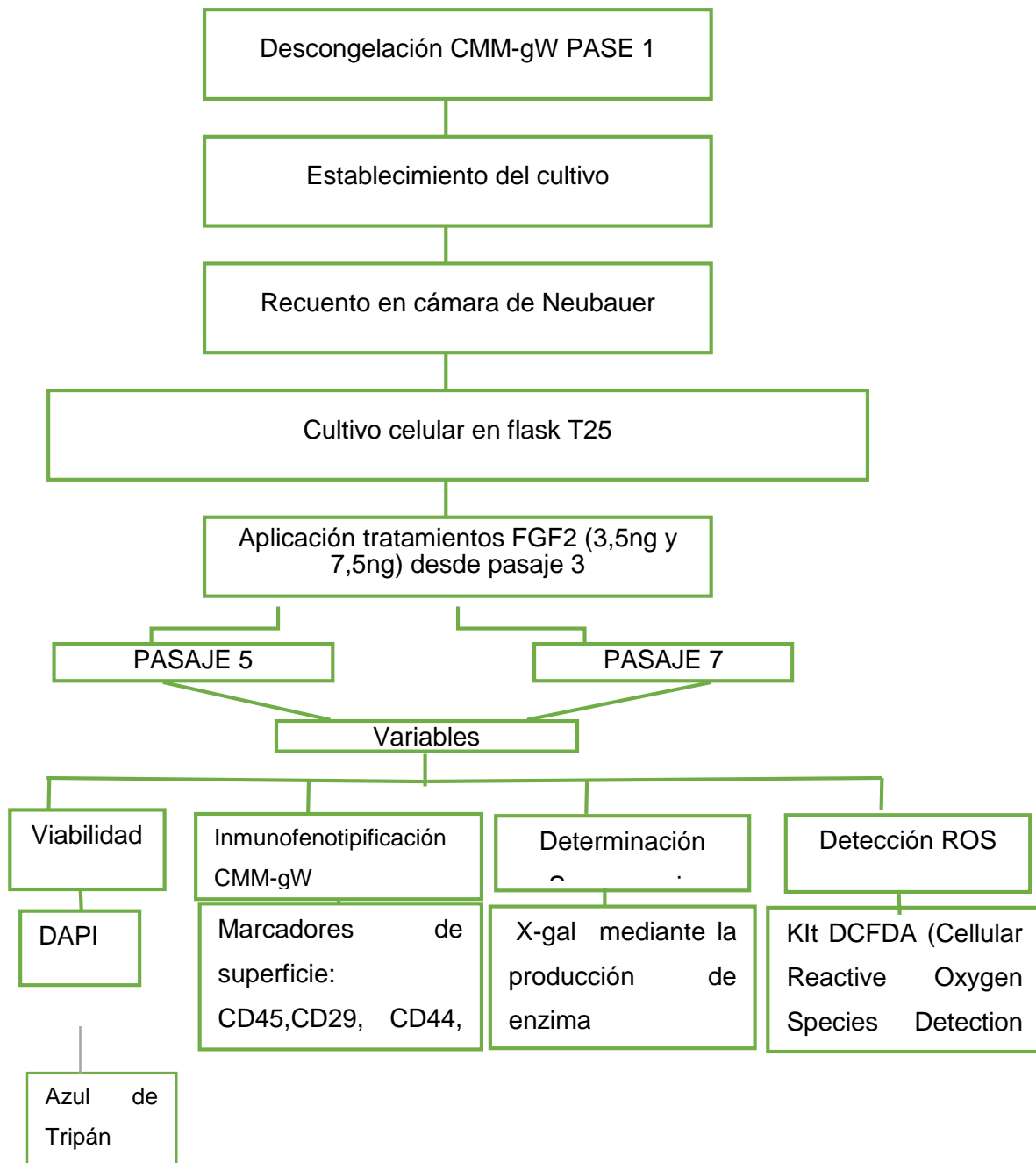
3.2 POBLACIÓN

Células madre mesenquimales obtenidas a partir de gelatina de Wharton, de cordón umbilical, donadas por la Universidad de Antioquia, congeladas el 20/09/2016 e identificadas como el vial #4 en pasaje #1. Descongeladas el 09/10/2017. Las CMM-gW se obtuvieron de donantes voluntarias sanas, quienes debían presentar las siguientes condiciones:

- Mujeres entre los 14 y 34 años de edad.
- Ausencia de trastornos genéticos y metabólicos
- Ausencia de enfermedades infecciosas como: hepatitis b y c, VIH,
- Aprobar y tener previo conocimiento, informado por el comité de ética del hospital universitario San Vicente de Paúl (HUSVP)

3.3 PLAN DE TRABAJO:

Figura 5. Planteamiento del trabajo.



Fuente: Autor.

3.4 ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO:

Las células se descongelaron utilizando el PNT 6 de descongelación (Anexo F) de CMM del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad del Tolima (Labioaut) donde se tomó el vial de CMM-gW del tanque de nitrógeno líquido y se llevó a baño maría a 37°C en un tiempo máximo de 2 min, esto con el fin de evitar que las CMM-gW sufran algún daño en sus membranas celulares. La solución celular se llevó a un tubo falcón de 15mL y se centrifugó a 1500 rpm durante 3 min, seguidamente, el sobrenadante fue removido y completado a un volumen de 1mL utilizando medio de cultivo, (DMEM bajo en glucosa, (Sigma)) (Tabla 5). Se realizó conteo celular por cámara Neubauer y las células fueron sembradas en un Flask T75 (75cm²) donde se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%. El primer cambio de medio, se realizó después de 4 días y con confluencia del 80 al 100%, las células se tripsinizaron y posteriormente fueron sembradas en flasks de T25, 25 cm², a una densidad de 2 x 10⁵ células mantenidas en las mismas condiciones.

Tabla 5. Componentes del medio de Cultivo para la manutención de CMM-gW.

Reactivo	Casa comercial	Volumen (volumen final: 25 ml)
DMEM bajo en glucosa	Sigma ref.d5523-10x/1l	14.625µl
SBF 20%	GIBCO ref:12657	5.000µl
Penicilina/estreptomicina 1%	Biowest cat n°:l0010-010	250µl
L-glutamina 0,5%	Sigma	125 µl

Fuente: Autor.

Después de establecidos los tratamientos, el cambio de medio se realizó cada 3 o 4 días dependiendo de la necesidad nutricional y el crecimiento del cultivo. Para ejecutar los pasajes y la tripsinización (Anexo B), se realizaron lavados con PBS 1X (por las siglas en inglés Phosphate Buffered Saline) a las células adherentes, se agregaron 0,5ml al 0,25% de tripsina (GIBCO® Ref.15400-054) y se colocaron durante 5 min en incubadora,

siguiente a esto, se llevó la solución a un tubo falcón de 15 mL donde se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min y se realizaron conteos celulares por medio azul de tripán 90% azul de tripan y 10% contenido celular en cámara Neubauer (Anexo A).

3.5 TRATAMIENTO CON FGF-2

Se aplicaron dos dosis de FGF-2 (Peprotech® Ref.405-33) (3,5ng y 7,5ng) al cultivo de CMM-gW, de la siguiente manera:

Tabla 6. Aplicación de tratamientos de FGF-2 en el cultivo de CMM-gW

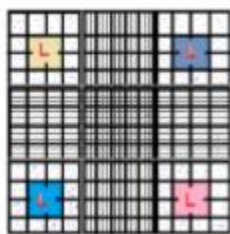
Tratamiento	Aplicación del tratamiento	Características de mantenimiento del cultivo	Pruebas	Características de mantenimiento del cultivo
FGF-2 3,5ng	Pasaje 3	Células en Flasks	Pasaje 5	Células en Cajas de
FGF-2 7,5ng	Pasaje 3	T25, mantenidas en		96 pozos, mantenidas
Control	Pasaje 3	incubadora	Pasaje 7	en incubadora
(Cultivo sin Factor)		humidificada a 37°C con 5% de CO2		humidificada a 37°C con 5% de CO2, hasta alcanzar un 50% de confluencia.

Fuente: Autor.

3.6 DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD.

El conteo de número de células vivas se realizó por la medición de la permeabilidad de membrana plasmática de la célula al azul de tripán. Para este procedimiento las células (10µL) fueron marcadas con azul de tripán (90 µL), el cual es un colorante que permite diferenciar las células viables de las que no lo son, mediante la pérdida de la permeabilidad de membrana que presentan las células no viables, tiñéndose de azul mientras que las células viables permanecen incoloras(Anexo A).

Seguidamente, la muestra fue homogenizada durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó conteo celular utilizando la cámara Neubauer y un microscopio invertido, (Advanced optical) donde el número de células por mL se calculó, multiplicando el promedio de los cuadrantes por el factor de dilución y por el volumen de la cámara, de la siguiente manera:



Utilizando la fórmula:

Concentración de Células = Cuenta de células vivas \times factor de dilución \times 10,000.

4

Para observar y cuantificar las células que presenten daños en la integridad del

Para la morfología de núcleos, las células fueron lavadas 3 veces durante 9 minutos (3min/lavado) con PBS (1X) y fijadas con Paraformaldehído (4%), durante toda la noche. Posteriormente, las células fueron lavadas de igual forma que al inicio del procedimiento y se les agregó DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) (Abcam® Ref.D1306) (1/1000; durante 5 min) para luego lavarlas de nuevo como se menciona anteriormente. Luego, se observaron en el sistema de fluorescencia Fluid™ Cell Imaging, para detectar la presencia de núcleos fragmentados o condensados, y determinar la viabilidad de estos.

3.7 INMUNOFENOTIPIFICACIÓN

La siguiente prueba se realizó en cajas de 96 pozos, donde se sembró una densidad de $2,5 \times 10^3$ cell/cm² por pozo. Después de que el cultivo adquiriera una confluencia entre el 50-70%, se efectuó identificación inmunofenotípica, mediante un panel de marcadores de superficie (CD45, CD29, CD 44, CD90). (Abcam®) siguiendo el PNT 3 del LABIOAUT (Anexo C). Inicialmente, las células se lavaron con PBS 1X (2 lavados) durante dos

minutos, seguidamente se fijaron utilizando Paraformaldehído al 4% a 4°C durante toda la noche, y se lavaron de nuevo con PBS 1X (5 Veces, 5 min). Para evitar la autofluorescencia de las células, se les agregó NH_4Cl (5mM), se lavó cada pozo con PBS1x (5 veces durante 5 min cada uno), posteriormente, se procedió a agregar la solución de bloqueo (20% SFB, 3% Tritón, 97% PB) durante 20 min a temperatura ambiente, terminado este paso se incubó el anticuerpo primario durante 16 h a 4°C, y se lavó nuevamente PBS 1X (5 lavados durante 5 min cada uno), después se incubó el anticuerpo secundario durante 2h a temperatura ambiente, se lavó nuevamente con PBS 1X para eliminar residuos de los anticuerpos, y se procedió a leer en el Fluid™Cell Imaging Station, todo este procedimiento se realizó en total oscuridad. Se realizaron 5 réplicas por cada marcador y se tomaron como referentes 4 campos por pozo. (Anexo C).

Tabla 7.Anticuerpos Monoclonales Utilizados en el estudio.

Anticuerpo Primario	Isotipo	Casa Comercial	Dilución	Anticuerpo secundario	Casa comercial	Dilución
CD44	IgG1	Abcam- Anti-CD44 antibody [KM201] (ab25340)	1:200	Alexa fluor 488 antirat	Abcam (Alexa Fluor® 488) (ab150157)	1:1000
CD29	IgG	Anti- Integrin beta 1 antibody	1:200			1:1000
CD90	IgG1	Anti-CD90 / Thy1 antibody [IBL-6/23] (ab3105)	1:300			1:1000
CD45	IgG2b	Abcam	1:250	Alexa fluor 405 antirabbit	Abcam (Alexa Fluor® 647) (ab150079)	1:1000

Fuente: Autor

3.8 IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS SENESCENTES

Esta prueba se realizó en cajas de 96 pozos, donde se sembró una densidad de $2,5 \times 10^3$ cell/cm² por pozo y, cuando el cultivo adquirió una confluencia entre el 50-70% se evaluó la actividad endógena de la enzima B-galactosidasa de la siguiente forma (Anexo D):

Inicialmente se lavó cada pozo con PBS 1X durante 2min a temperatura ambiente, con agitación manual suave. Después las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, se incubaron a 4°C durante toda la noche, y se lavaron con PBS 1X 3 veces (5 Min) para posteriormente adicionarse la solución de tñido, la cual contiene:

Tabla 8. Solución de detección de enzima B-galactosidasa

Reactivo	Volumen
	Volumen final: (3mL)
X gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside) en DMF (Dimetil formamida) de 1mg/mL	40 μ L
Ferrocianuro de potasio 100mM	75 μ L
Ferricianuro de potasio 100mM	75 μ L
MgCl ₂ 1M	30 μ L
NaCl 5M	75 μ L
Solución citrato de sodio ácido cítrico 0,1M y fosfato de sodio 0,2M, pH: 6,0	2.600 μ L

Fuente: Autor

La detección de las células senescentes se da mediante la utilización del sustrato: 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactósido (X-Gal)(Panreac Ref:A1007,0500) el cual es hidrolizado por la β -galactosidasa dando lugar a galactosa y 5-bromo-4 cloro-3-hidroindol, este último compuesto, es oxidado a 5-5'-dibromo-4-4'-dicloro que al dimerizar da lugar a un precipitado de color azul. Tanto la dimerización como la oxidación

de la enzima B-galactosidasa, requieren de la transferencia de electrones, provenientes de los iones de hierro del ferrocianuro y Ferricianuro de potasio, Además se utilizaron como cofactores enzimáticos en la reacción al NaCl y el MgCl₂ (Bay, Kong, & Tang, 2011; Del Nogal -Avila, 2012).

Después de agregada la solución de tinción, se incubaron a 37°C sin CO₂ durante 24 horas, posteriormente se visualizaron a 3 campos en 20X y se determinó el número de células teñidas mediante la utilización de un microscopio invertido. El anterior protocolo fue estandarizado por Bay et al.,(2011) y Dimri et al., (1995). Como control positivo se utilizaron CMM-gW expuestas a luz UV durante 30 min.

3.9 ESTRÉS OXIDATIVO

Las especies reactivas de oxígeno se identificaron, durante los pasajes 5 y 7, esta prueba se realizó en cajas de 96 pozos, donde se sembró una densidad de $2,5 \times 10^3$ cell/cm² por pozo, después de que el cultivo adquiriera una confluencia entre el 50-70% se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS y se usó el Kit Celular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (Orange Fluorescence) (ab186028) (Anexo D). Posteriormente, se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 2h. Como control positivo, se usaron células tratadas con peróxido de hidrógeno 0,2 mM (H₂O₂) en una solución estándar de PBS (1x). En paralelo, las células control se trataron con la misma solución de PBS que carece de H₂O₂ durante 4h. Este control fue estandarizado previamente donde se utilizó la misma concentración de H₂O₂ a diferentes tiempos (4h-8h-12h-24h) Mostrando un menor daño en la membrana celular a las 4h facilitando la detección de ROS. Finalmente las células se observaron por medio del Flouo™Cell Imaging Station donde se determinó a una intensidad de 570nm.(Abcam, 2016).

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizaron 5 pruebas en el cultivo de CMM-gW tratadas con las dos dosis de FGF-2 (3,5ng y 7, 5 ng) durante los pasajes 5 y 7, se llevaron a cabo 5 réplicas por experimento. Se utilizó el programa estadístico Infostat (versión 2014) donde se aplicó la prueba de Shapiro-Wilks para determinar la distribución de los datos. La viabilidad y la proliferación se midieron mediante cuantificación celular con azul de tripán, mientras que la integridad nuclear de estas células fue medida con DAPI. La senescencia, se midió mediante la detección de la enzima B-galactosidasa, los resultados se presentaron en promedios y desviación estándar. Donde, los resultados que presentaron un valor menor a 0,05 se consideraron como significativos, los resultados con una distribución anormal, fueron analizados mediante análisis de varianza no paramétrico, utilizando la prueba Kruskal Wallis.

Tabla 9. Variables utilizadas en el desarrollo del proyecto.

Prueba	Variable Dependiente	Variable Independiente		Prueba estadística	Tipo de Estadística	
		Grupo de tratamiento	Pasaje			
Inmunofenotipificación	Identificación de CMM	FGF-2 Dosis (3,5 ng-7,5ng)	5	Análisis de normalidad de distribución Shapiro-WilkS	Paramétrica	Anova con medidad repetidas
Estrés Oxidativo	Intensidad media de fluorescencia					
Actividad B-galactosidasa	Número de células senescentes	Control Positivo	7		No paramétrica	Kruskal-wallis para la comparación de tratamientos.
DAPI	Integridad del núcleo					
Azul de Tripán	Número de células vivas					

Fuente: Autor

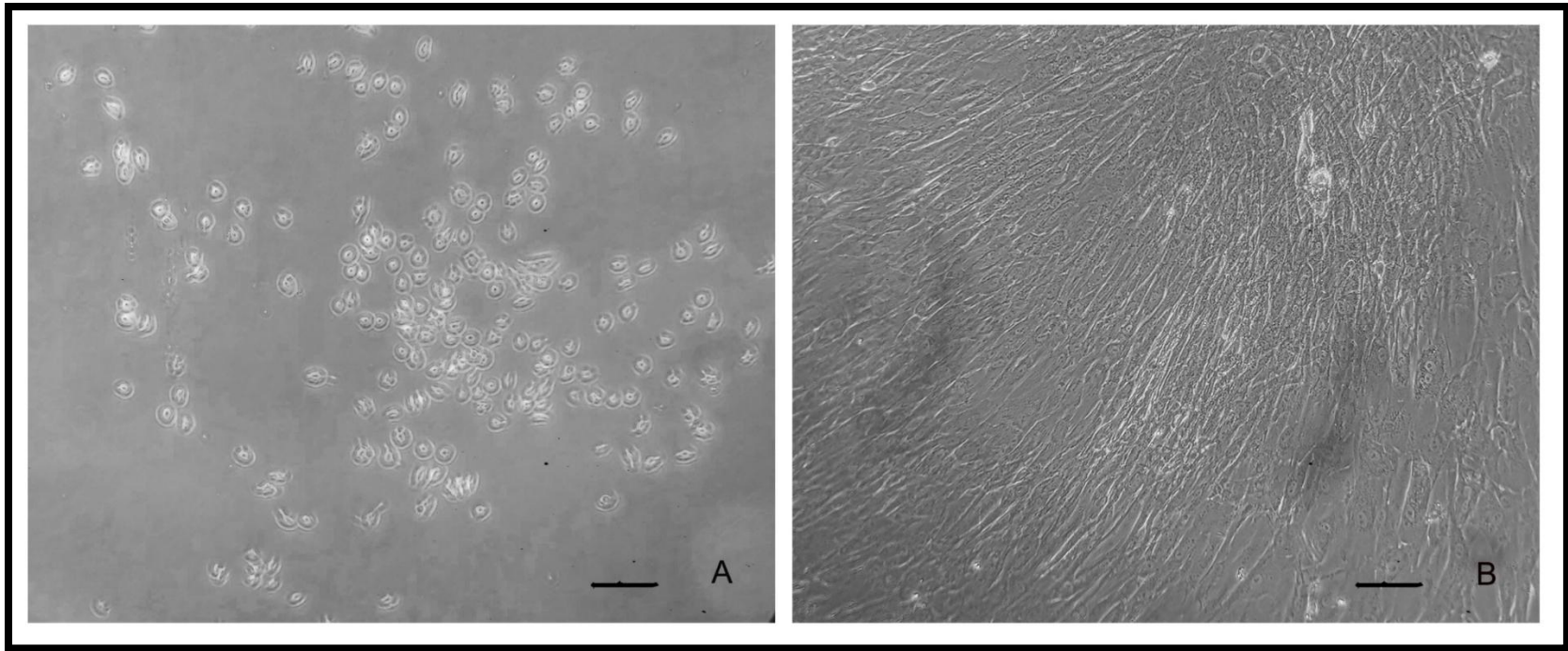
4. RESULTADOS

4.1 VIABILIDAD DEL CULTIVO DE CM-gW TRATADO CON FGF-2 EN DOSIS DE 3,5 Y 7,5 ng, UTILIZANDO EL REACTIVO AZUL DE TRIPÁN Y DAPI.

Los cambios morfológicos en el cultivo de CMM-gW fueron determinados mediante microscopia invertida, desde el momento de la descongelación del vial donde se obtuvieron aproximadamente un 70% de células viables, las cuales fueron sembradas en un flask T75, (figura. 6-A), éstas células fueron mantenidas bajo las condiciones descritas en la metodología. Inicialmente las células tardaron 3 semanas para encontrarse en un 90% de confluencia, donde tomaron morfología fibroblastoide, alargada (figura 6-B), propia de las CMM, esto posiblemente se deba al estrés en el momento de la descongelación. En los siguientes pasajes, su tiempo de proliferación para alcanzar la confluencia se redujo a una semana, pero al llegar a pasaje 6 este aumentó nuevamente, obteniendo un cultivo confluyente a los 15 días, cabe resaltar que en los dos tratamientos y el control se presentó la misma tendencia de cultivo.

Durante la aplicación de los tratamientos de FGF-2 no se observaron cambios en la morfología celular respecto al control, adicionalmente durante los pasajes 3, 4 y 5 no se lograban detectar visualmente diferencias entre los tratamientos de FGF2 y el control (figura. 7), sin embargo, en los pases 6 y 7 se apreció una mayor proliferación celular en las CM-gW tratadas con FGF-2 respecto a las del control (figura.7)

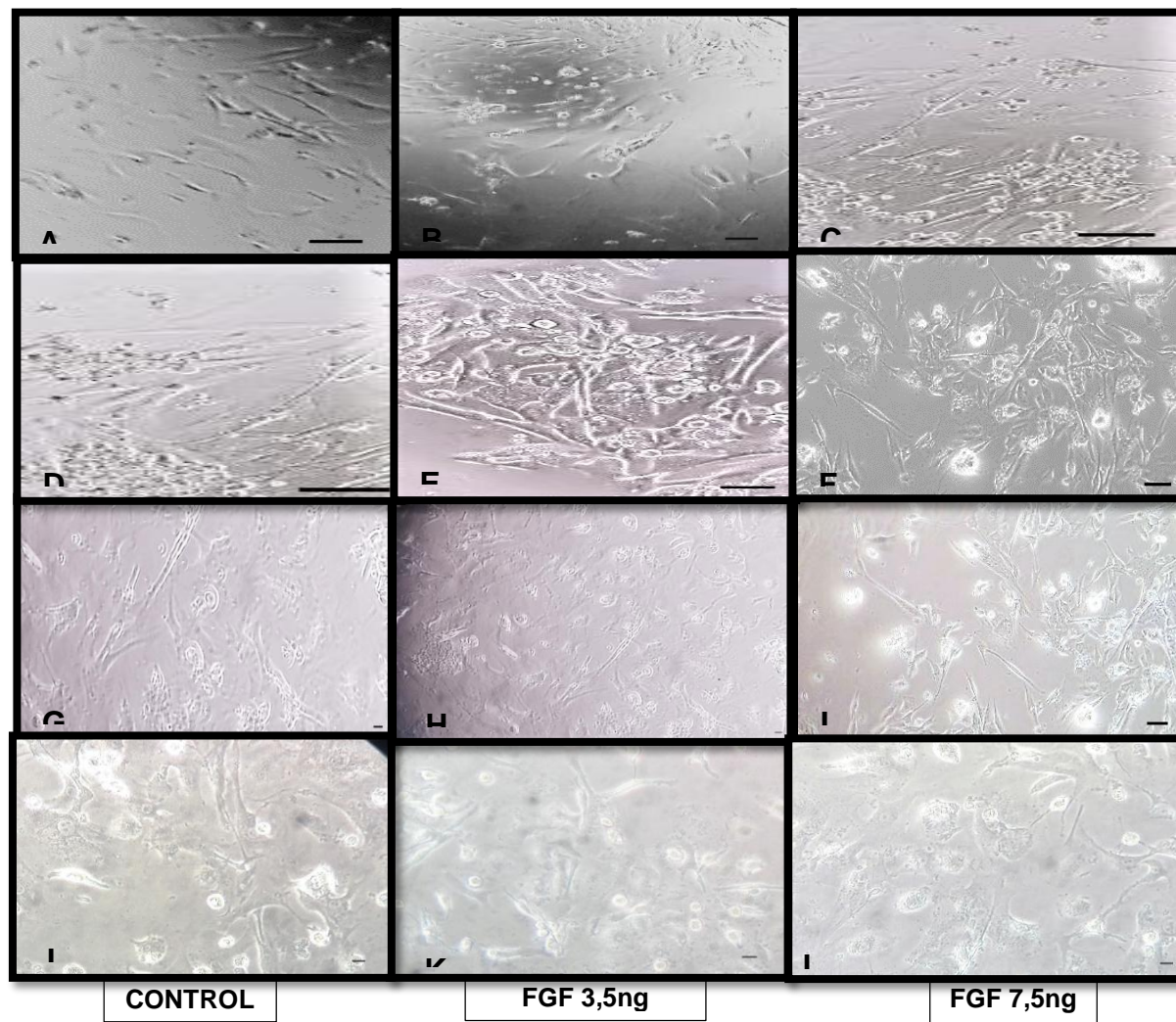
Figura 6. Imagen digitalizada del cultivo CMM-gW en 10x.



(A) Células descongeladas en el primer día, aún conservan forma redondeada pasaje 2. (B) Establecimiento del cultivo, pasaje 2, las células han adquirido forma fibroblastoide y se encuentran en 90% de confluencia. Barra de escala= 10um.

Fuente: Autor

Figura 7. Imagen digitalizada de CMM-gW durante cada pasaje celular.



Fotografías tomadas en microscopio invertido a (10X y 20X), Barra de escala= 10 μ m.

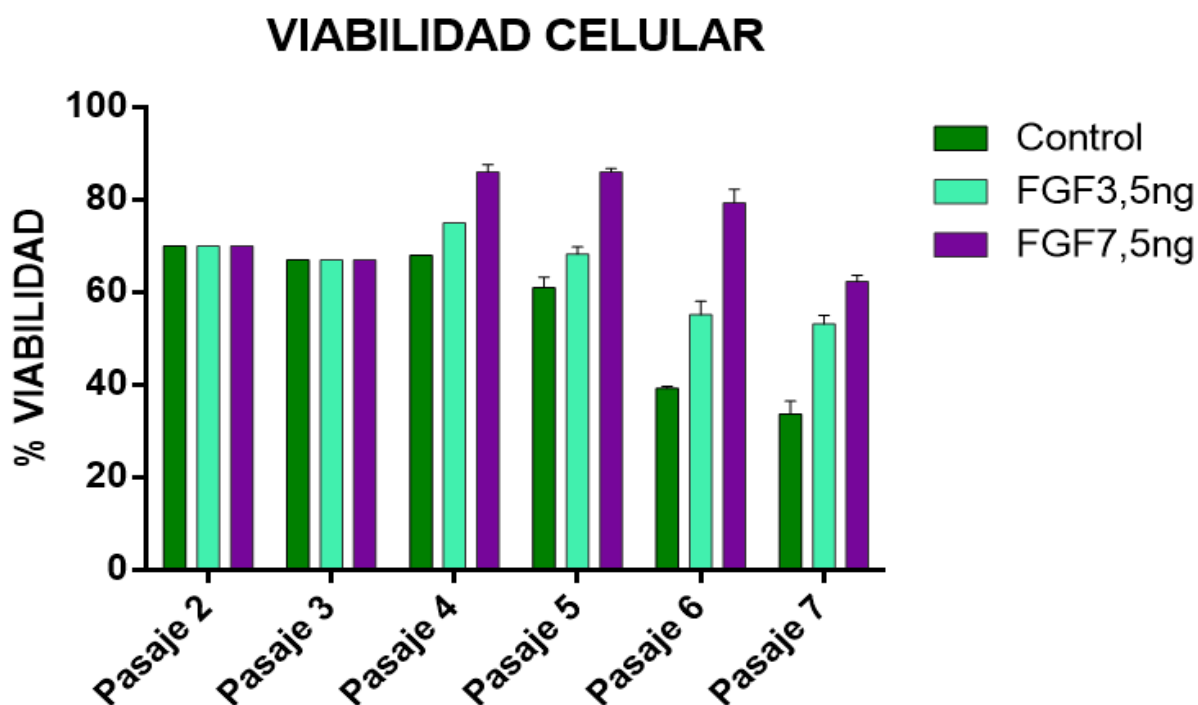
Fuente: Autor

Inicialmente el cultivo presenta un porcentaje de células vivas del 70%, dado, posiblemente al estrés sufrido durante el proceso de congelación y descongelación, este porcentaje se mantiene estable en pasaje 3 (67%) , pero al llegar al pasaje 4, se evidencia un incremento en la proliferación celular, solamente en los cultivos tratados con FGF-2: dosis de 3,5 ng (75%) y de 7,5 ng (86%), mientras que el control permanece estable (68%).

Sin embargo, a medida que aumentó el tiempo de crecimiento en el cultivo, disminuyó la proliferación celular, para pasaje 5, el control tenía una viabilidad de (61%), el tratamiento de FGF-2_{3,5ng} (68%) y el tratamiento de FGF-2_{7,5ng} permaneció estable (86%), para pasaje 6 se presentó una disminución notable en el cultivo control del 22% donde se observó que solo el 39% de las células eran viables y en los tratamientos aunque también hubo una disminución de la viabilidad, se presentó un menor impacto en el cultivo, FGF-2_{3,5ng} (55%), FGF-2_{7,5ng} (79%), para el pasaje 7, la viabilidad del cultivo decreció, tanto en el control (34%), como en los factores, FGF-2_{3,5ng} (53%), FGF-2_{7,5ng} (62%), a pesar de ello las dosis del FGF-2, muestran una mayor proliferación celular respecto al control y una disminución de la viabilidad del cultivo de manera acentuada (figura. 8) demostrando que la aplicación del FGF-2, reduce el proceso de senescencia y muerte celular, prolongando la vida útil del cultivo.

4.2 VIABILIDAD CELULAR MEDIADA POR LA FRAGMENTACIÓN NUCLEAR.

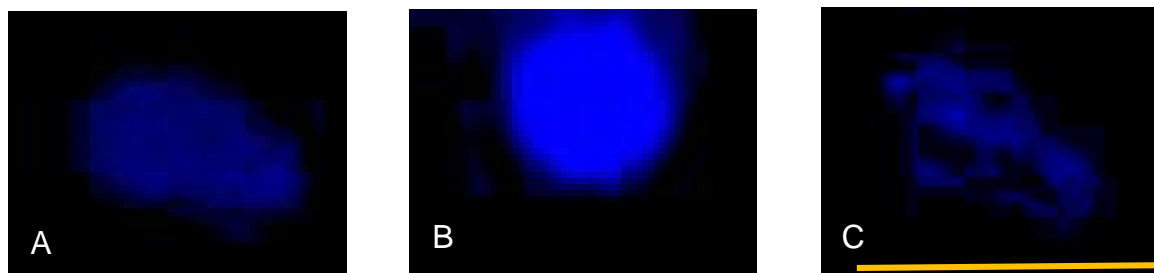
Figura 8. Gráfico de evaluación de la viabilidad celular, utilizando Azul de tripán durante cada pasaje.



Fuente: Autor

Los núcleos celulares teñidos con DAPI, observados durante el pasaje 5, presentaban diferentes características, algunos núcleos, no sufrieron daño, y no exhibían cambios en su morfología (figura. 9, A), lo cual fue determinado mediante comparación visual, respecto al grupo control positivo, que consistía en la aplicación de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al cultivo, sin embargo, otros núcleos presentaban cromatina condensada, observándose de una coloración intensa, (figura 9, B), otros pocos mostraron fragmentación, evidenciando daño en su morfología (figura. 9, C).

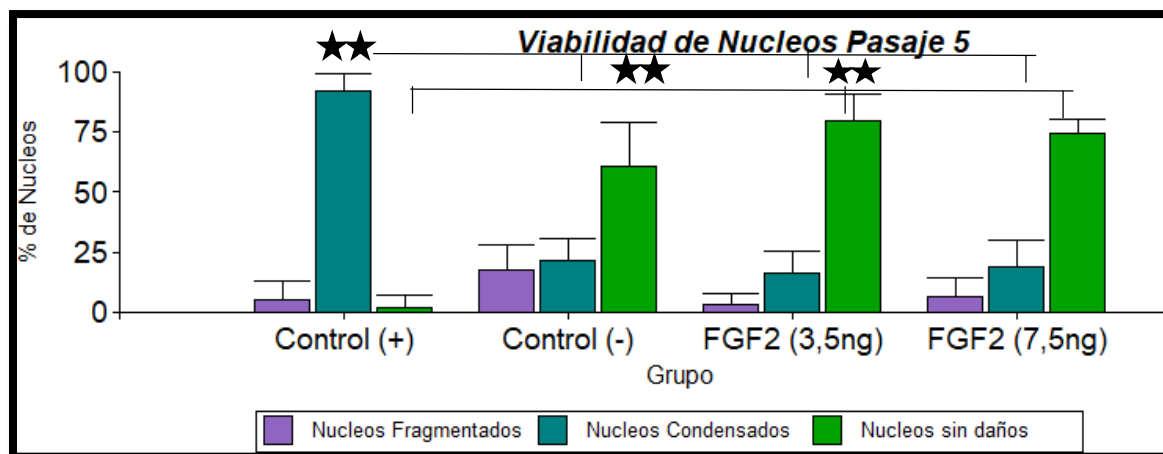
Figura 9. Viabilidad de Núcleos en pase 5, utilizando DAPI, Control Negativo.



A. Núcleo sin daños; B. Núcleos condensados, C. Núcleo fragmentado. Imágenes tomadas en Floid™ Cell Imaging, 100μM-20X. Barra de escala= 10 μm

Fuente: Autor

Figura 10 Grafico de morfología nuclear, utilizando DAPI, en el pasaje 5.



Los resultados se representan de la siguiente manera: Porcentaje de Núcleos (ordenadas), Grupo (abscisas). Con un N de 20, se obtuvo una normalidad ($p < 0,0001$) con una significancia del 99,5%, \pm Error estándar (ESM). Los valores de p se obtuvieron comparando el grupo control con cada grupo de tratamiento. Diferencias significativas () $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

Fuente: Autor

Al realizar la prueba de normalidad de Shapiro- wills se evidenció, que los datos no tienen una distribución normal ($p < 0,0001$), por lo tanto se analizaron los datos mediante Kruskal Wallis, donde se evidenciaron núcleos sin daño en los grupos experimentales FGF-2_{3,5ng} y FGF-2_{7,5ng}, con una significancia 99,5 ($p = 0,0049$; $H = 12,81$) (Anexo G), este resultado, también se comprobó en el porcentaje de núcleos que presentan daño por

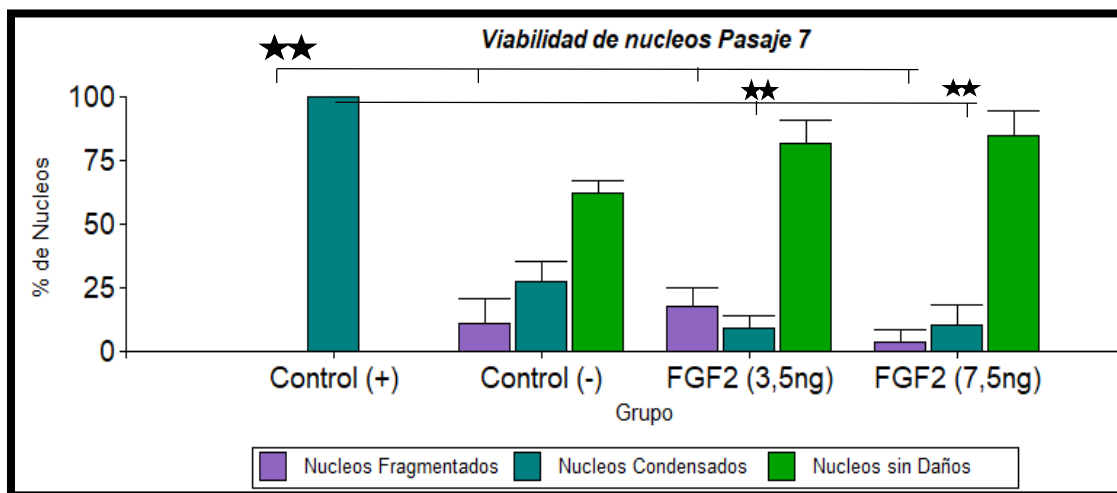
fragmentación, donde las dos dosis de FGF-2, presentan una diferencia significativa respecto al control positivo, ($p=0,0977$; $H=6,04$) (Anexo G), y se confirma la diferencia presentada entre los tratamientos FGF-2 con los resultados de los núcleos condensados, mostrando una diferencia significativa respecto al control ($p=0,090$; $H=11,55$)(Anexo G). Cabe recalcar que en el control positivo se observa de manera marcada la presencia de núcleos con daño, sin embargo hay un mayor porcentaje de núcleos dañados por condensación, comparado con el porcentaje de núcleos fragmentados, (figura 10), estas diferencias se ven también reflejadas en los núcleos que presentan daños en los tratamientos con FGF-2, sin embargo no se ve representado de manera significativa (Figura 10.).

La prueba de Kruskal-Wallis, fue también utilizada para evaluar la viabilidad de núcleos en el pasaje 7, evidenciando una diferencia significativa del 99,5%, entre los tratamientos de FGF-2 y el control positivo, ($p=0,0049$; $H=12,61$)(Anexo G), esta diferencia entre tratamientos de FGF-2 y control positivo también se demostró en los núcleos que presentan daños por condensación, mostrando una significancia de 99,5% ($p=0,035$; $H=13,42$)(Anexo G). Sin embargo, en el caso de fragmentación de núcleos ocurre algo distinto puesto que hay un mayor porcentaje de núcleos fragmentados en el tratamiento de FGF-2_{3,5ng} la cual no puede ser comparable con el control positivo, puesto que en este caso al utilizar H₂O₂ como control, los daños se presentan por condensación de cromatina, y no por fragmentación nuclear, situación similar ocurre con el control negativo, al cual no se le aplicaron dosis del FGF-2, debido a que los daños presentados en los núcleos, eran en su mayoría daños por fragmentación, sin embargo al compáralos con el tratamiento de FGF-2_{7,5ng} muestra una diferencia significativa (99,5%) ($p=0,0072$; $H=10,55$) (Anexo G), (figura. 11).

Al realizar una comparación entre los núcleos sin daños del pasaje 5 y el pasaje 7, se logra apreciar un efecto positivo del FGF-2 en las dos dosis, respecto al control negativo, debido a que se aprecia que mantiene estable el porcentaje de núcleos que no presentan daño alguno, caso contrario a lo que sucede en el control negativo donde se observa una disminución del porcentaje de núcleo sin daño en el pasaje 7. (Figuras 10; 11),

igualmente se observa una disminución de los núcleos condensados, utilizando las dos dosis del FGF-2 a pesar de ello, el tratamiento de FGF-2 en la dosis de 3,5ng muestra un pequeño aumento en el porcentaje de núcleos fragmentados (figuras. 10; 11).

Figura 11. Gráfico de morfología nuclear, utilizando DAPI, en el pasaje 7.



Los resultados se representan de la siguiente manera: Porcentaje de Núcleos (ordenadas), Grupo (abscisas), \pm ESM. Los valores de p se obtuvieron comparando el grupo control con cada grupo de tratamiento. Diferencias significativas (): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$; (****): $p < 0,0001$.

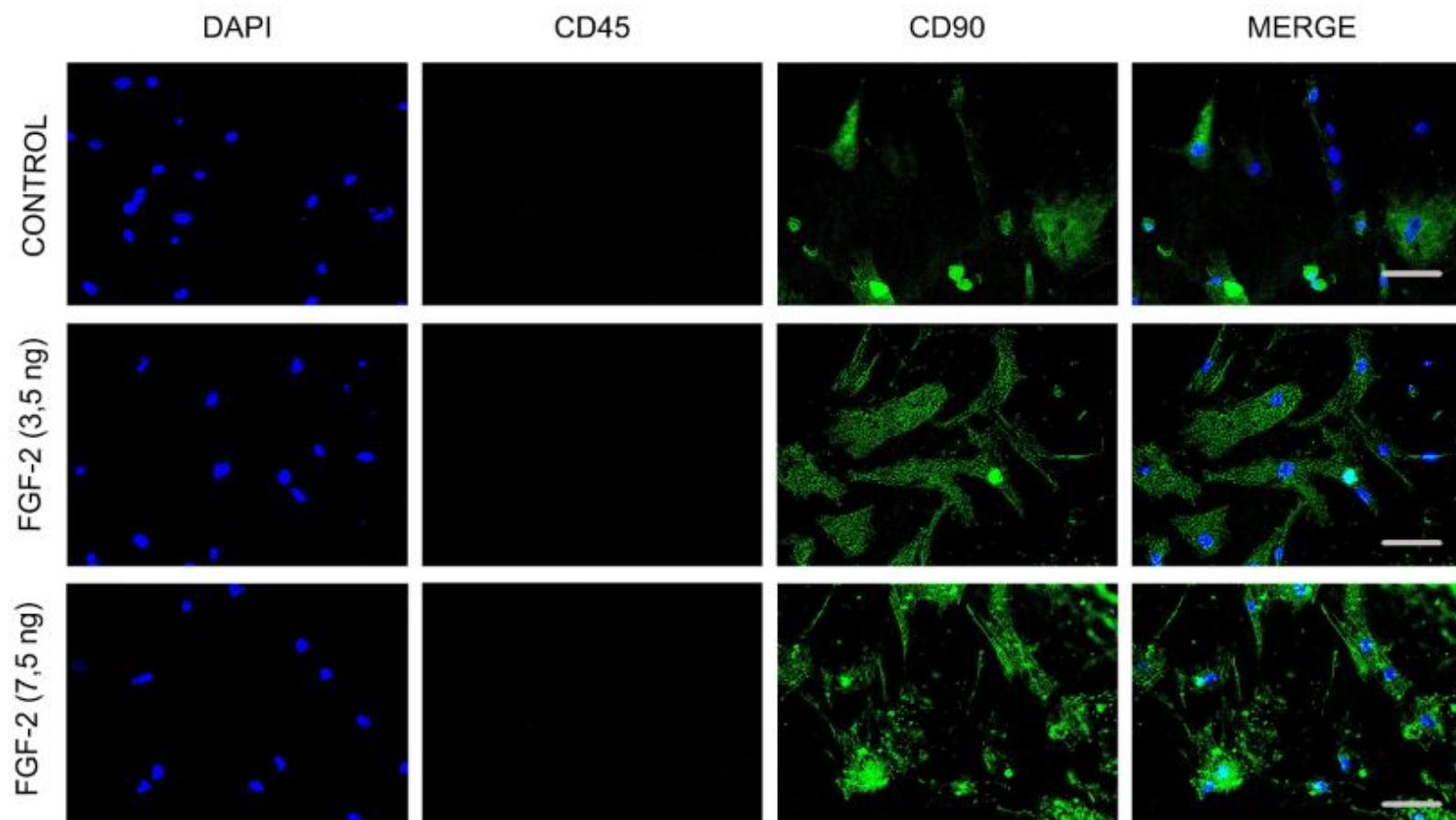
Fuente: Autor

4.3 INMUNOFENOTÍPIFICACION DEL CULTIVO DE CMM-gW TRATADO CON FGF-2 EN DOSIS DE 3,5 Y 7,5 ng DURANTE LOS PASAJES, 5 Y 7 UTILIZANDO LOS MARCADORES DE SUPERFICIE CD45, CD29, CD44, CD90.

Para determinar que el cultivo de CMM-gW pertenecía al linaje mesenquimal se utilizaron marcadores positivos como: CD29, CD90 Y CD44 los cuales al ligarse a sitios de unión específicos en la membrana de la célula, emitían una señal de coloración verde, también se utilizó un marcador de membrana para la identificación de células hematopoyéticas, CD45, que, en caso tal de presentarse, actuaba de la misma forma que los marcadores positivos de CMM, emitiendo una señal visible en luz roja.

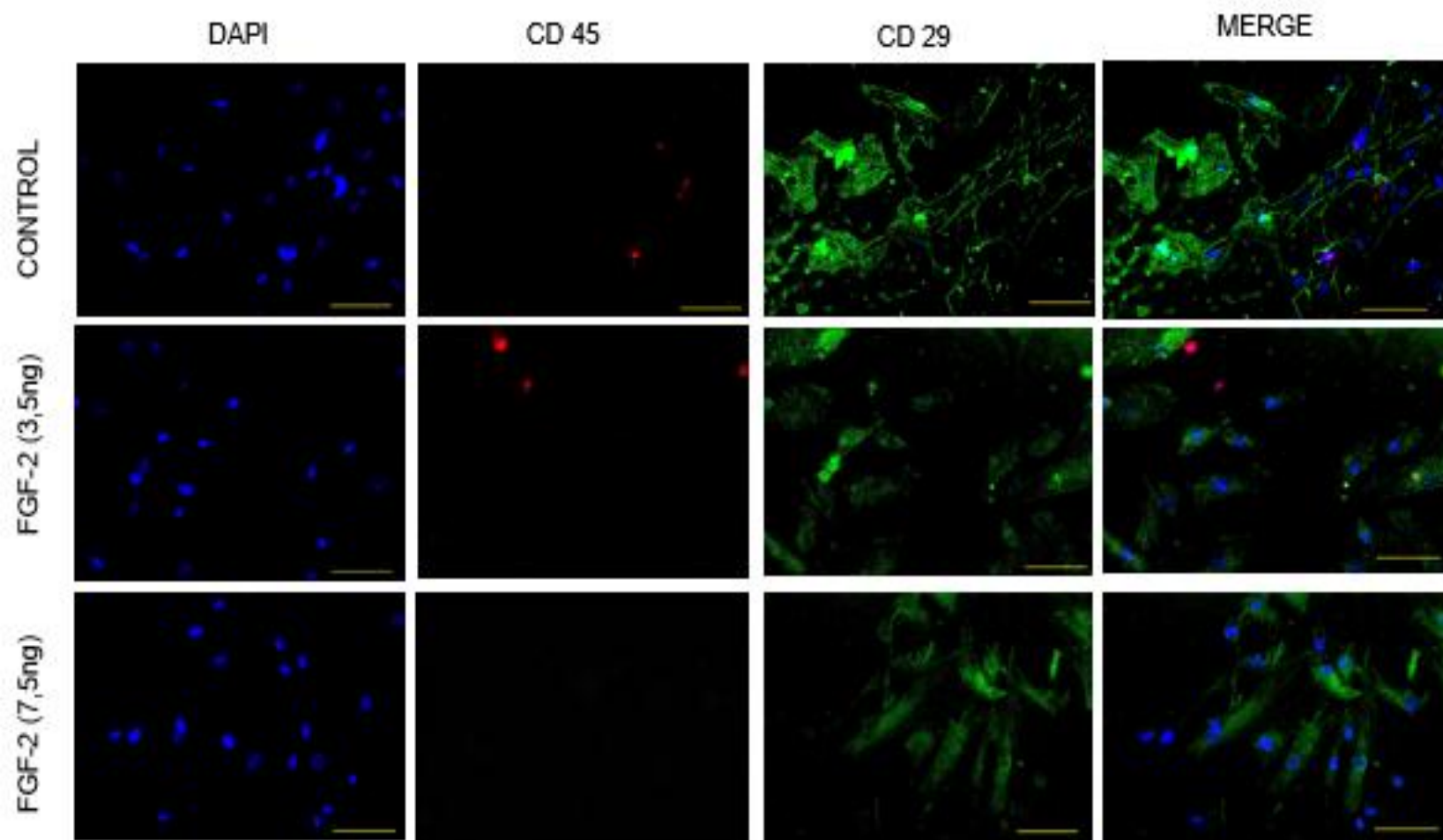
Los resultados obtenidos en pasaje 5, confirman que el cultivo no presenta contaminación perteneciente al linaje hematopoyético, igualmente se detectó, la presencia de CMM en el cultivo, (figuras 12 y 13), evidenciando mediante observación, que el tratamiento de FGF-2 $7,5\text{ng}$ presenta diferencias significativas respecto a los otros dos tratamientos con una significancia del 99,5% ($p=0,0109$; $H=6,74$) (Anexo G), debido a la no presencia de células hematopoyéticas en el cultivo, en los otros dos casos, aunque el cultivo presentaba CMH, estas eran escasas, el porcentaje encontrado de CMH, tanto en control negativo como en el tratamiento con FGF-2 $3,5\text{ng}$ no superó el 25%.

Figura 12 Imagen digitalizada de la Inmunofenotipificación celular de un cultivo de CMM-gW durante pasaje 5, utilizando el anticuerpo CD90.



Fuente: Autor

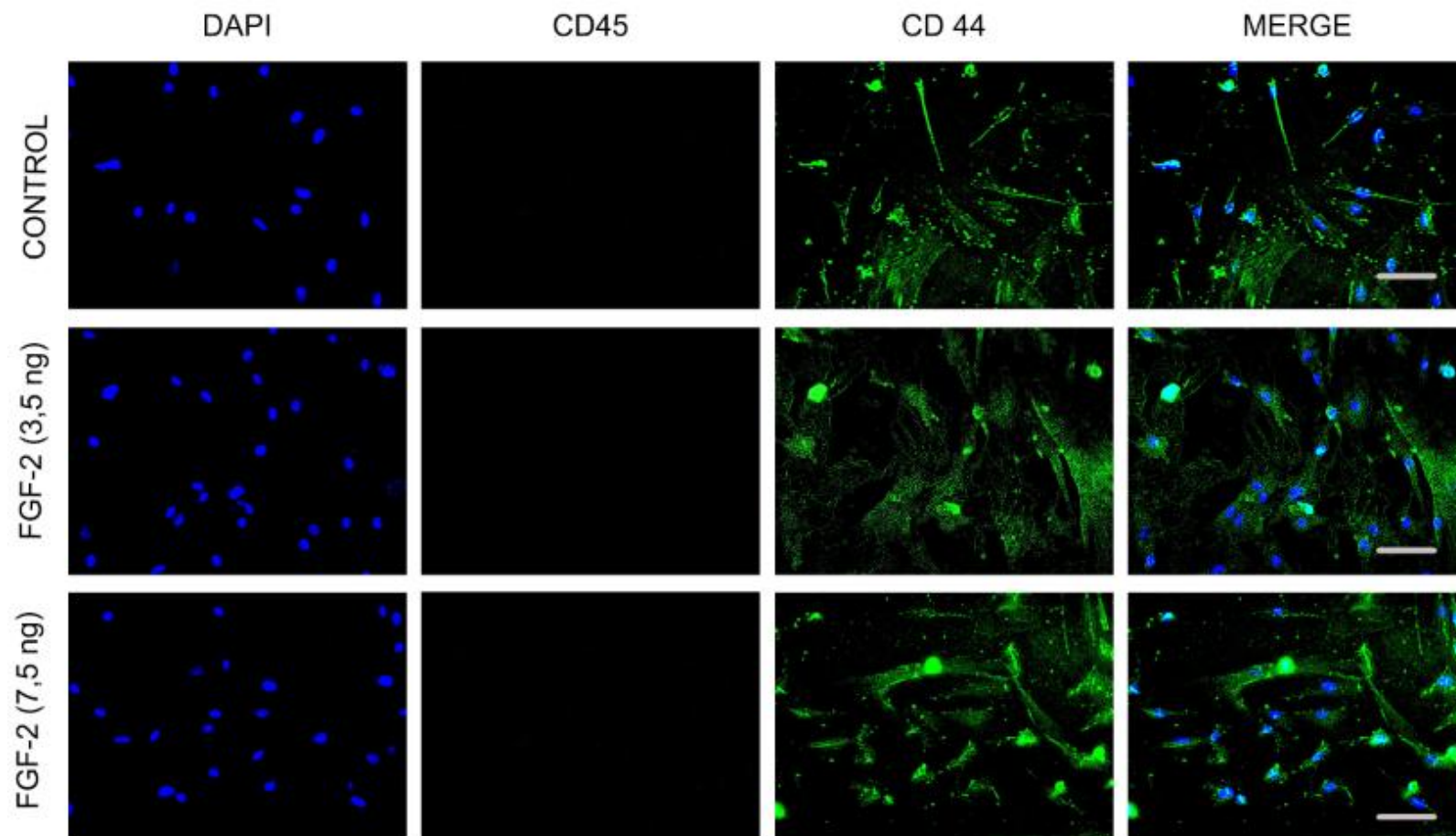
Figura 13. Imagen digitalizada de la Inmunofenotipificación celular de un cultivo de CMM-gW durante pasaje 5. Utilizando el anticuerpo CD 29.



Barra de escala= 10 μ m

Fuente: Autor

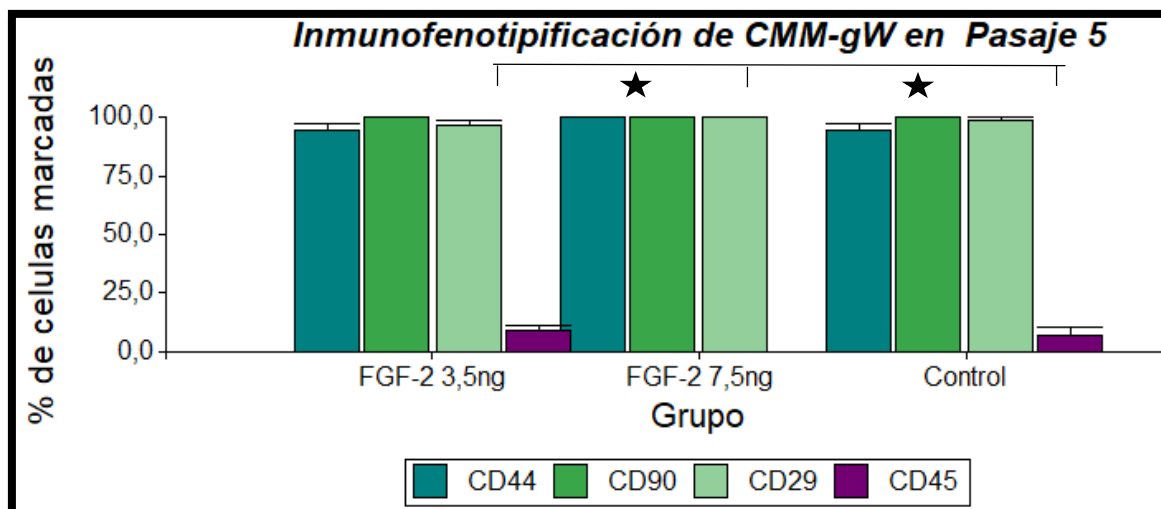
Figura 14. Imagen digitalizada de la Inmunofenotipificación celular de un cultivo de CMM-gW durante pasaje 5. Utilizando el anticuerpo CD 44.



Barra de escala= 10 μ m

Fuente: Autor

Figura 15. Gráfico de Inmunofenotipificación celular en el cultivo de CMM-gW en pasaje 5.

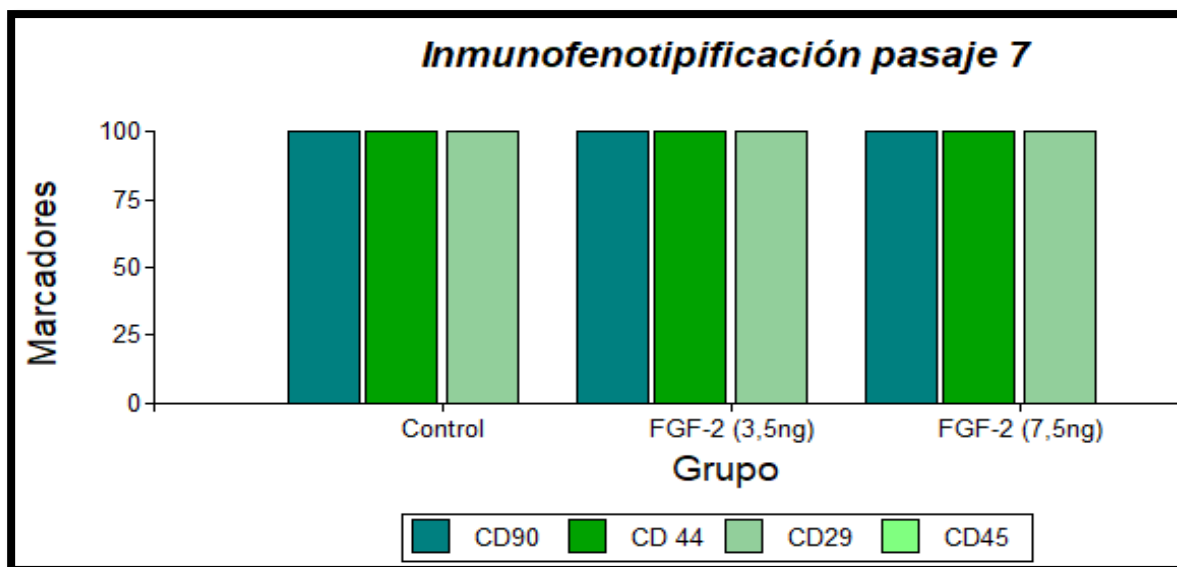


Los resultados se muestran de la siguiente manera: % de células Marcadas (ordenadas), Grupo (abscisas, \pm ESM). Los valores de p se obtuvieron comparando el grupo control con cada grupo de tratamiento. Diferencias significativas () $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

Fuente: Autor

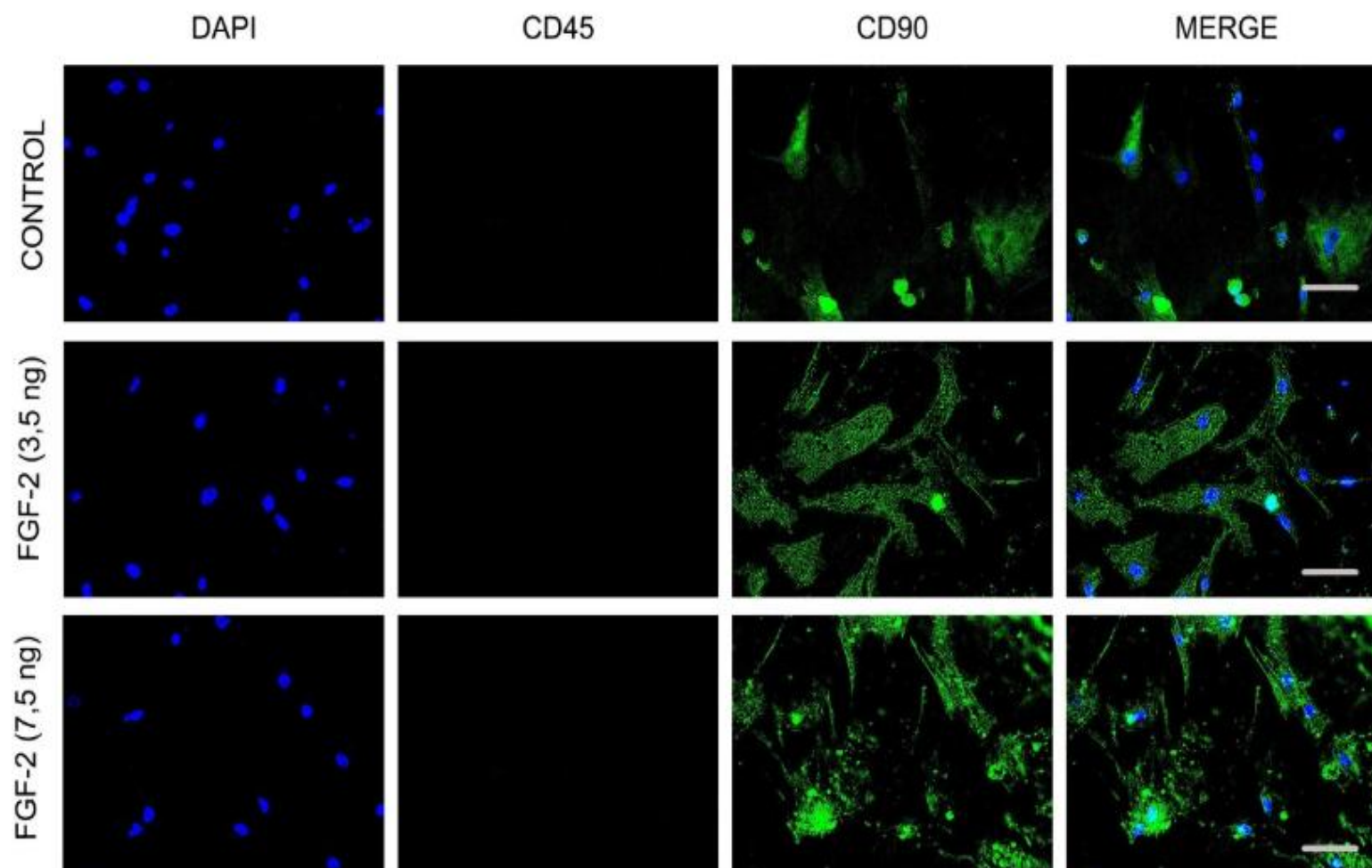
En Pasaje 7, la Inmunofenotipificación de CMM-gW reveló, la ausencia total de células hematopoyéticas, tanto en los tratamientos de FGF-2 como en el control, adicionalmente se evidenció que un 100% del cultivo pertenece al linaje mesenquimal, debido a que no se presenta marcaje de células con CD45, demostrando que el FGF-2, en estas dosis no induce a una diferenciación hacia linaje hematopoyético (figuras. 14 y 15). Adicionalmente aunque no hace parte de este objetivo, se puede apreciar un mayor número de CMM-gW en el tratamiento de FGF-2 7,5ng (figura. 15), comparando con los otros dos tratamientos.

Figura 16. Gráfico de Inmunofenotipificación celular en el cultivo de CMM-gW en pasaje 5.



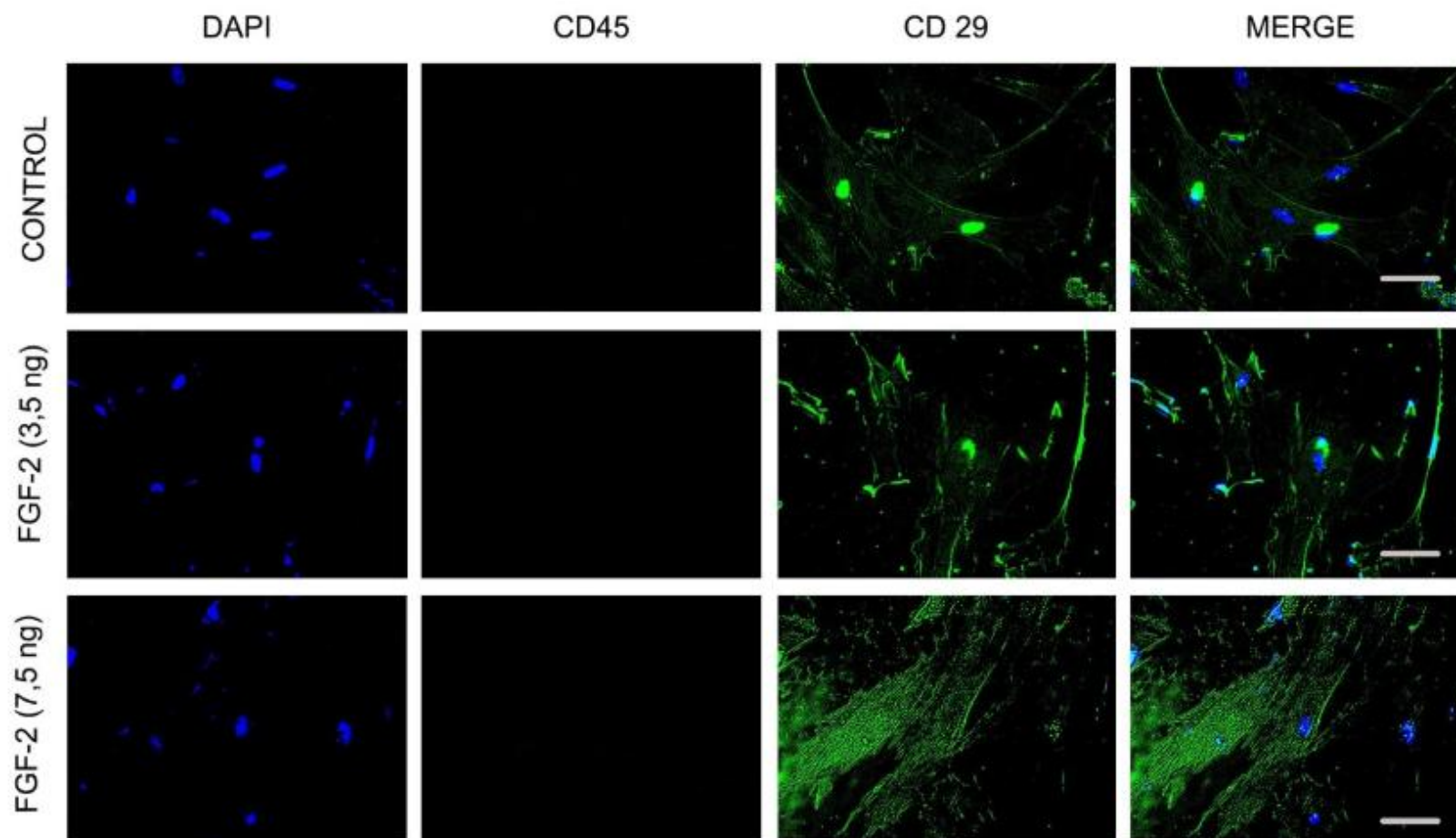
Fuente: Autor

Figura 17. Imagen digitalizada de la Inmunofenotipificación celular de un cultivo de CMM-gW durante pasaje 7. Utilizando el anticuerpo CD90



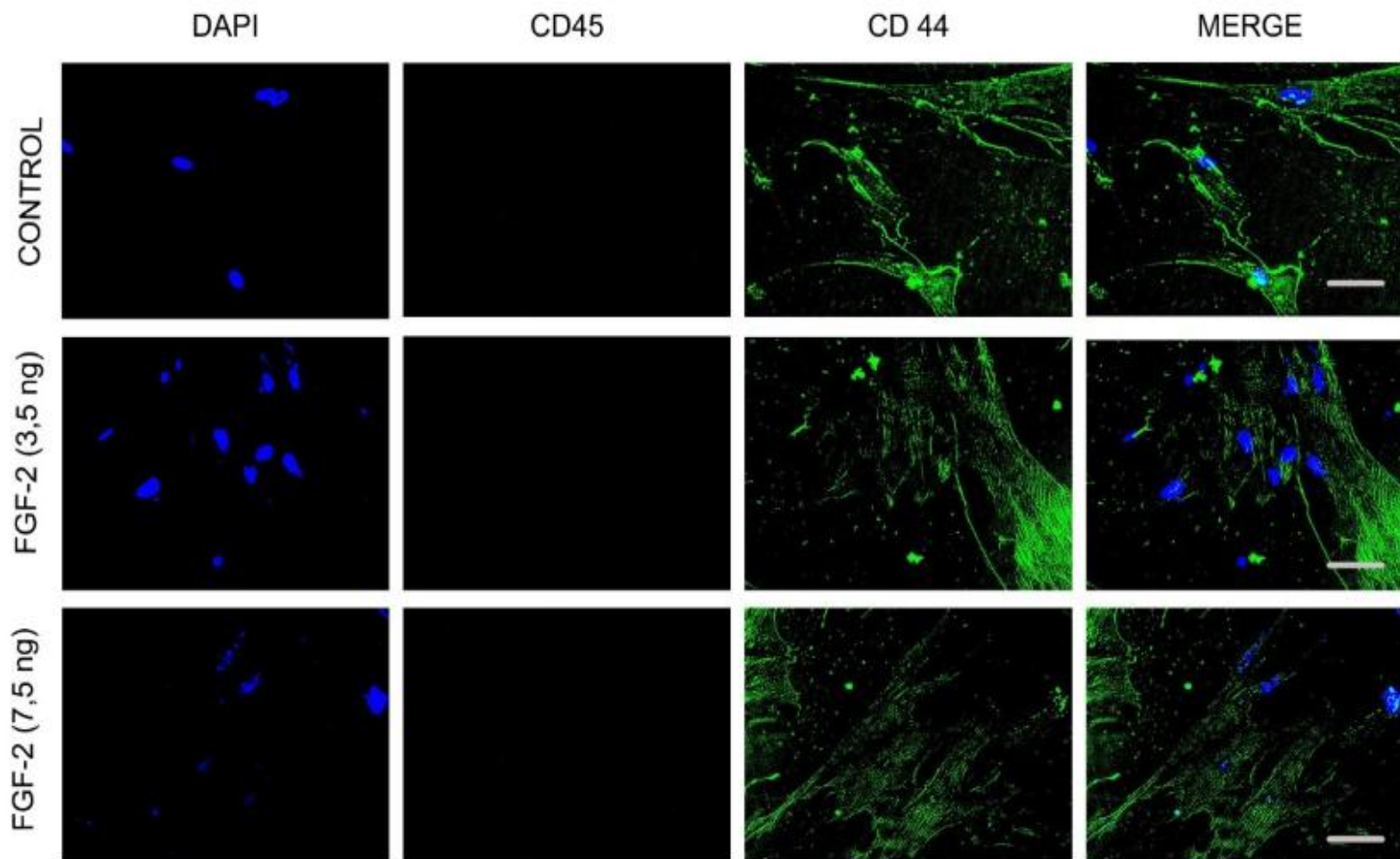
Fuente: Autor

Figura 18. Imagen digitalizada de la Inmunofenotipificación celular de un cultivo de CMM-gW durante pasaje 7. Utilizando el anticuerpo CD29 .



Fuente: Autor

Figura 19. Imagen digitalizada de la Inmunofenotipificación celular de un cultivo de CMM-gW durante pasaje 7. Utilizando el anticuerpo CD44.



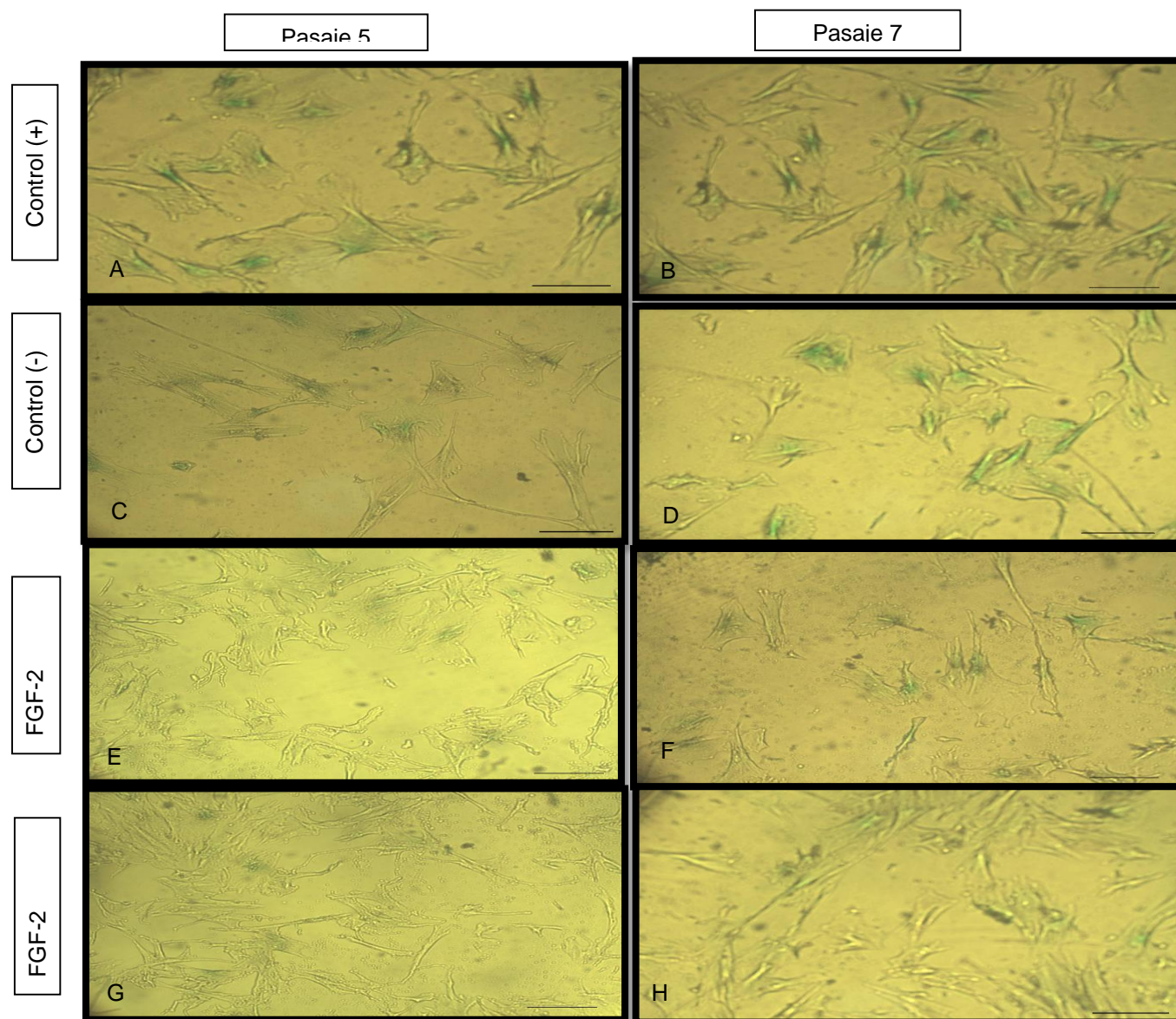
Fuente: Autor

4.5 EFECTO DEL FGF-2 EN DOSIS DE 3,5 Y 7,5 ng SOBRE LA SENESCENCIA DE CMM-gW DURANTE LOS PASAJES, 5 Y 7 MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA B-GALACTOSIDASA.

El estado de senescencia celular se determinó por la presencia del marcador β -galactosidasa en las CMM-gW durante los pasajes 5 y 7, evidenciando un aumento en la producción de la enzima β -galactosidasa en el pasaje 7, en todos los tratamientos, en comparación con el pasaje 5 (Figura. 16). Se observó también, un cambio en la morfología, como lo son aumento de tamaño y forma alargada, que junto a la presencia de la coloración azul dada por la producción lisosomal de la enzima β -galactosidasa, confirman el estado senescente del cultivo.

Para determinar la senescencia celular, se analizó el porcentaje de células totales vs células senescentes, tanto en pasaje 5 como en pasaje 7, los datos no mostraron normalidad, ($p=0,004$) por lo cual, se efectuó un análisis de varianza no paramétrico, en este caso se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, donde los resultados demostrados en porcentaje en el pasaje 5, evidencian una diferencia significativa del 99,5% ($p=0,0022$; $H=14,22$) entre el control (+) respecto a los tratamientos de FGF-2 (Figura. 17), sin embargo respecto al control negativo, aunque también se observan diferencias (Figura. 17), estas no son significativas. Evaluando el Pasaje 7, la diferencia dada entre los tratamientos de FGF-2 y el control (+) aumenta, mostrando una significancia de 99,5% ($p=0,0007$ $H=15,22$) (Figura 18) (Anexo G).

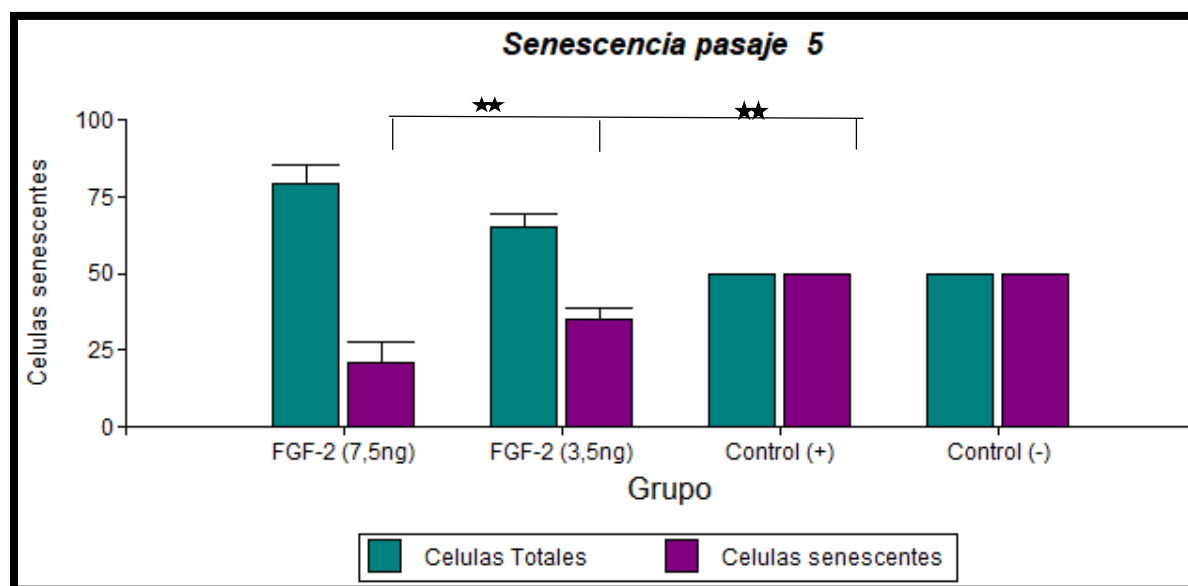
Figura 20. Imagen digitalizada de un cultivo de CMM-gW marcadas con el reactivo X-gal.



A) Control positivo utilizando UV, en pasaje 5. B). Control positivo utilizando UV, en pasaje 7. C). Control negativo, en pasaje 5. D) Control negativo en pasaje 7. E) FGF-2 3,5ng en pasaje 5, F) FGF-2 3,5ng en pasaje 7. G) FGF-2 7,5ng en pasaje 5. H) FGF-2 3,5ng en pasaje 7. Fotografías tomadas en microscopio invertido a , magnificación 20X, Barra de escala= 10 μ m

Fuente: Autor

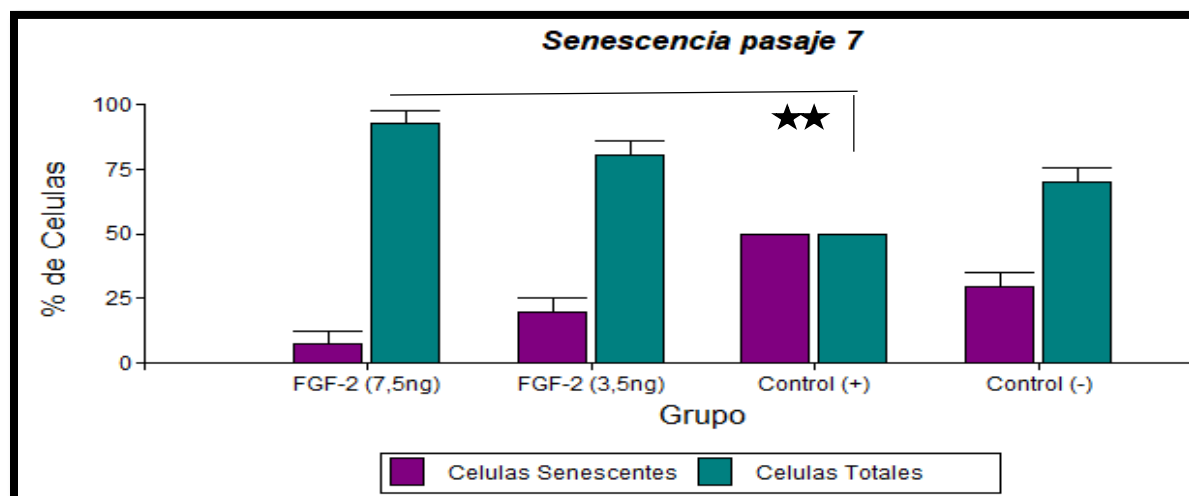
Figura 21. Senescencia celular pasaje 5.



Los resultados se muestran de la siguiente manera: % de Células (ordenadas), Grupo (abscisas) \pm ESM. Los valores de p se obtuvieron comparando el grupo control con cada grupo de tratamiento. Diferencias significativas () $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Fuente: Autor

Figura 22. Senescencia celular pasaje 7.

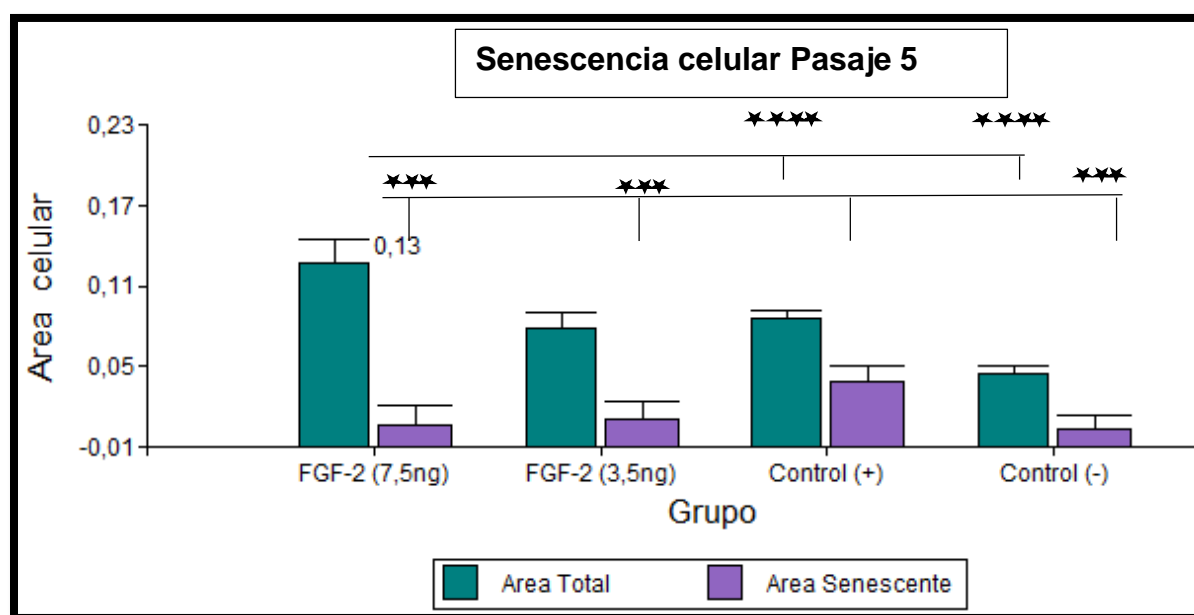


Los resultados se muestran de la siguiente manera: % de Células (ordenadas), Grupo (abscisas) \pm ESM. Los valores de p se obtuvieron comparando el grupo control con cada grupo de tratamiento. Diferencias significativas () $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

Fuente: Autor

De esta manera se logró determinar un aumento en el total de células senescentes, sin embargo para este estudio, también se consideró como factor importante el área teñida de X-gal debido a que al aumentar el número de lisosomas, aumenta también la producción de la enzima β -galactosidasa, encontrándose que en el pasaje 5 tanto el control (-), como los tratamientos con FGF-2 presentaban una diferencia significativa respecto al control positivo, con una normalidad $<0,001$ y una significancia del 99,5%. ($p=0,001$; $H=40,17$) (Figura. 19) (Anexo G). Sin embargo al comparar en pasaje 7 el área de las células senescentes, no se encontró diferencia significativa entre el control (+) y los tratamientos, sin embargo, si se observa un cambio en la morfología bastante notorio como es el aumento de tamaño celular, representado en el área total de la célula (Figura 20).

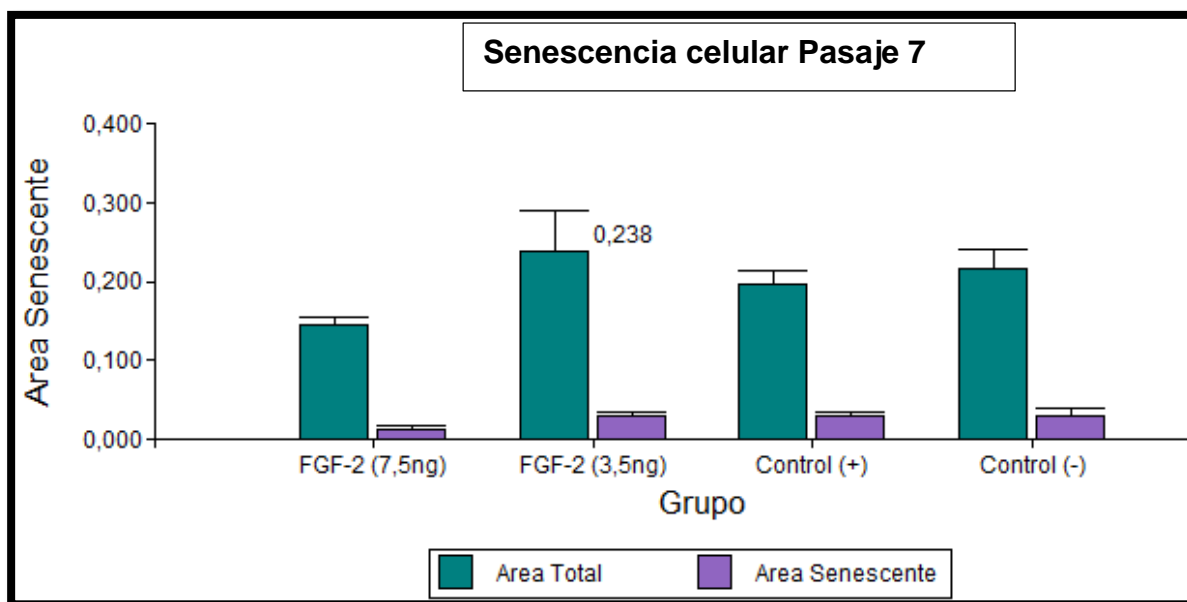
Figura 23. Gráfico de Área de Senescencia celular en el pasaje 5.



Los resultados se muestran de la siguiente manera: Área Celular (ordenadas), Grupo (abscisas), \pm ESM. Los valores de p se obtuvieron comparando el grupo control con cada grupo de tratamiento Diferencias significativas () $p<0,05$; (**) $p<0,01$; (***) $p<0,001$; (****) $p<0,0001$.

Fuente: Autor

Figura 24. Gráfico de Área de Senescencia celular en el pasaje 7.



Los resultados se muestran de la siguiente manera: Área Celular (ordenadas), Grupo (abscisas), \pm ESM. Los valores de p se obtuvieron comparando el grupo control con cada grupo de tratamiento. Diferencias significativas () $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

Fuente: Autor

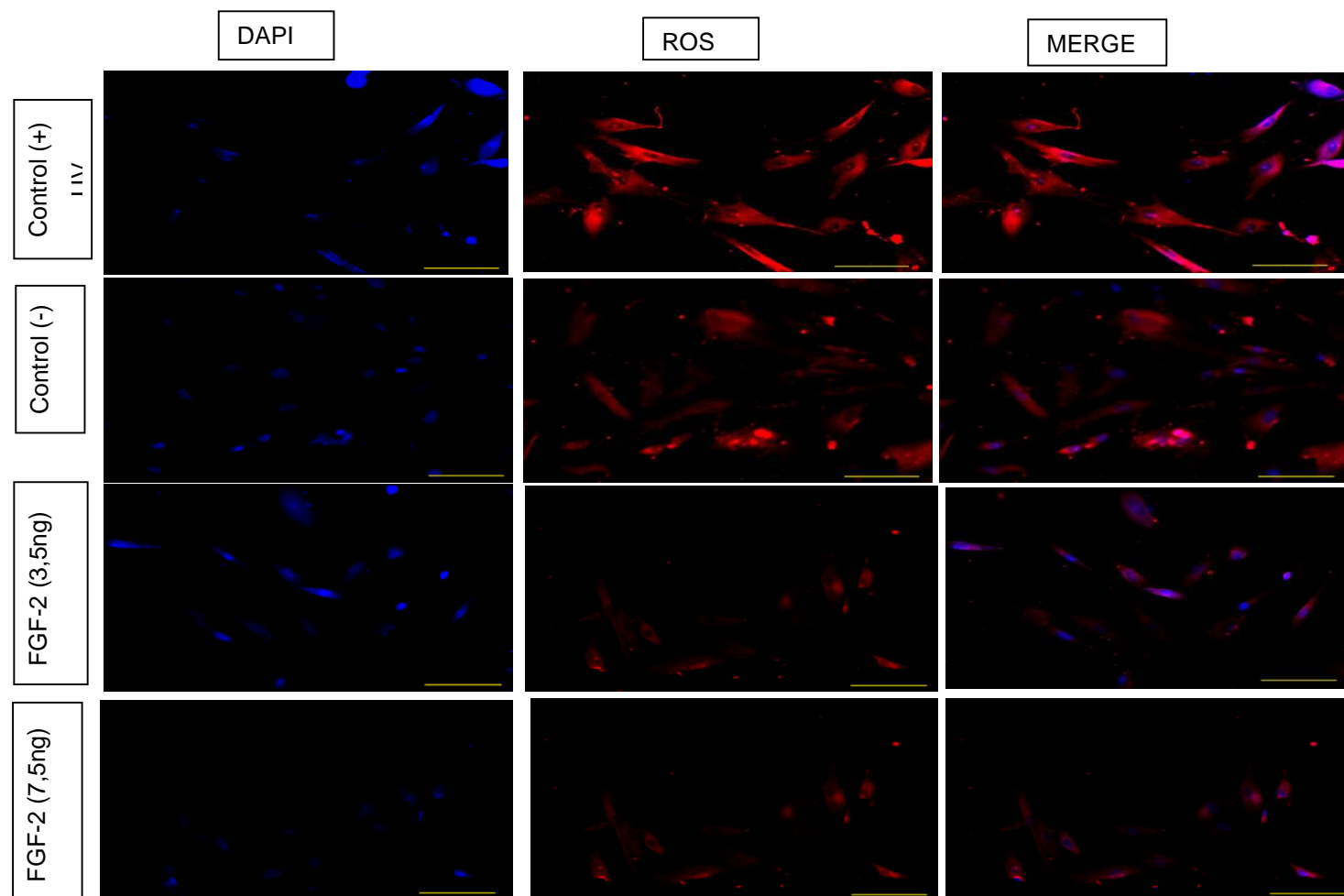
4.6 ESTRÉS OXIDATIVO DE CMM-gW TRATADAS CON FGF-2 EN DOSIS DE 3,5 Y 7,5 ng DURANTE LOS PASAJES, 5 Y 7 MEDIANTE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).

La senescencia ha sido asociada con la producción de radicales libres, por tal razón se evaluó la producción de estos utilizando un kit de detección de ROS, tanto en pasaje 5 como en pasaje 7 donde se determinó mediante la medida de intensidad de las CMM-gW, que al presentar ROS generan fluorescencia, visible en campo rojo, que indicaba la presencia de O_2 y OH^- .

De esta manera se determinó que la producción de ROS, se presentó en mayor proporción, tanto en los controles, positivo (inducido por estrés en el cultivo con H_2O_2), como en el negativo, (células no tratadas con FGF-2) (figura. 21). Al realizar el análisis

estadístico, se encontró que en pasaje 5, los tratamientos comparados con los controles, no presentaron diferencias significativas, caso contrario a lo ocurrido en pasaje 7, donde las CMM-gW tratadas con FGF-2 demostraron una diferencia significativa respecto al control positivo, con significancia del 99,5% ($p=0,006$; $H=17,34$). (Anexo G) (Figuras 22 y 23). Lo cual se puede apreciar en las (fig 21 y fig 22). Se evidenció también un incremento menor en la producción de ROS en los tratamientos con FGF-2, sin embargo, este no es notorio como en las células control negativo, donde no se adicionó ningún factor que promoviera el crecimiento celular (Figura 23).

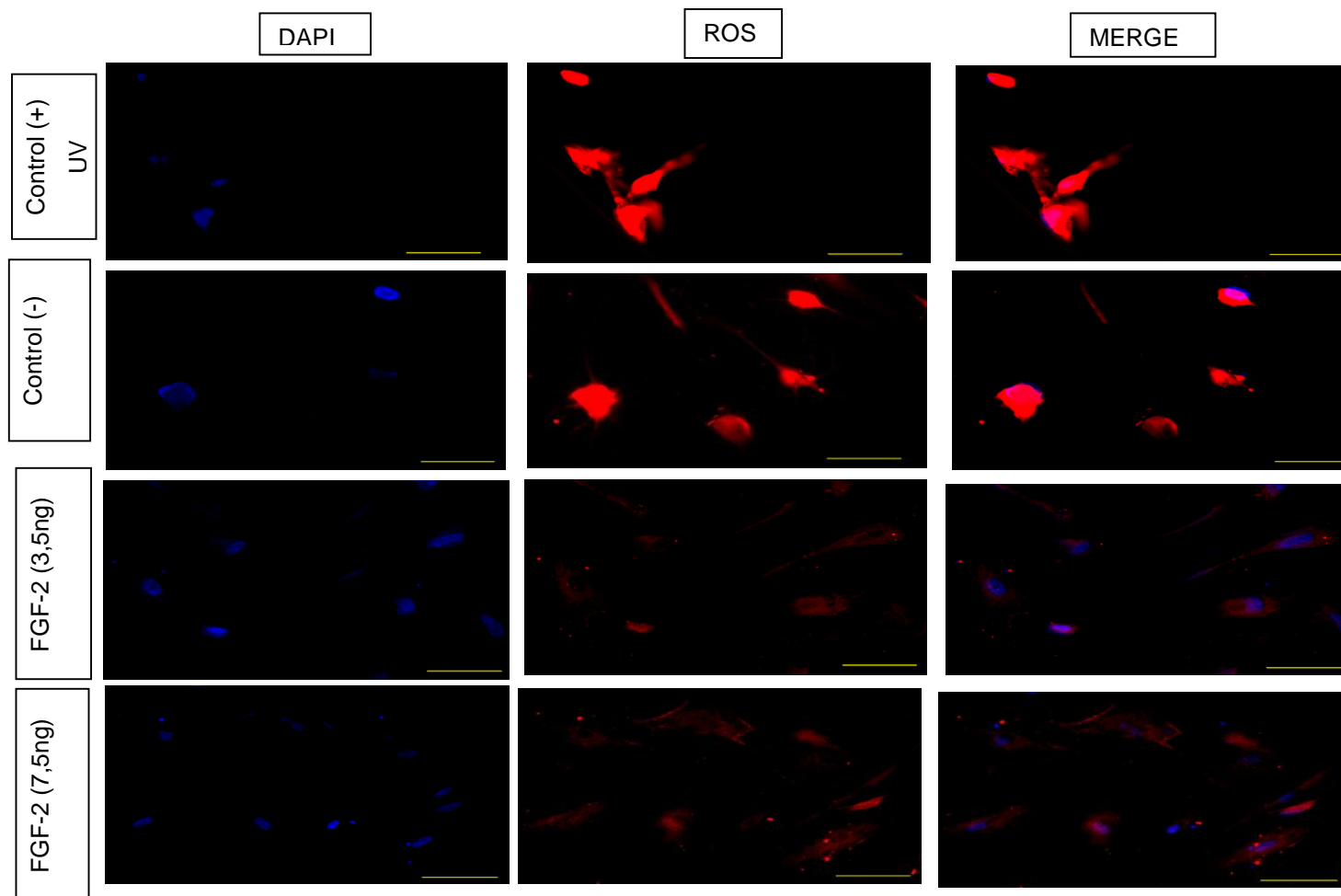
Figura 25. Imagen digitalizada de un cultivo de CMM-gW Estrés Oxidativo de CMM-gW durante pasaje 5.



Fotografías tomadas en Flouid™Cell Imaging Station Magnificación: 20X, Barra de escala= 10 µm.

Fuente: Autor

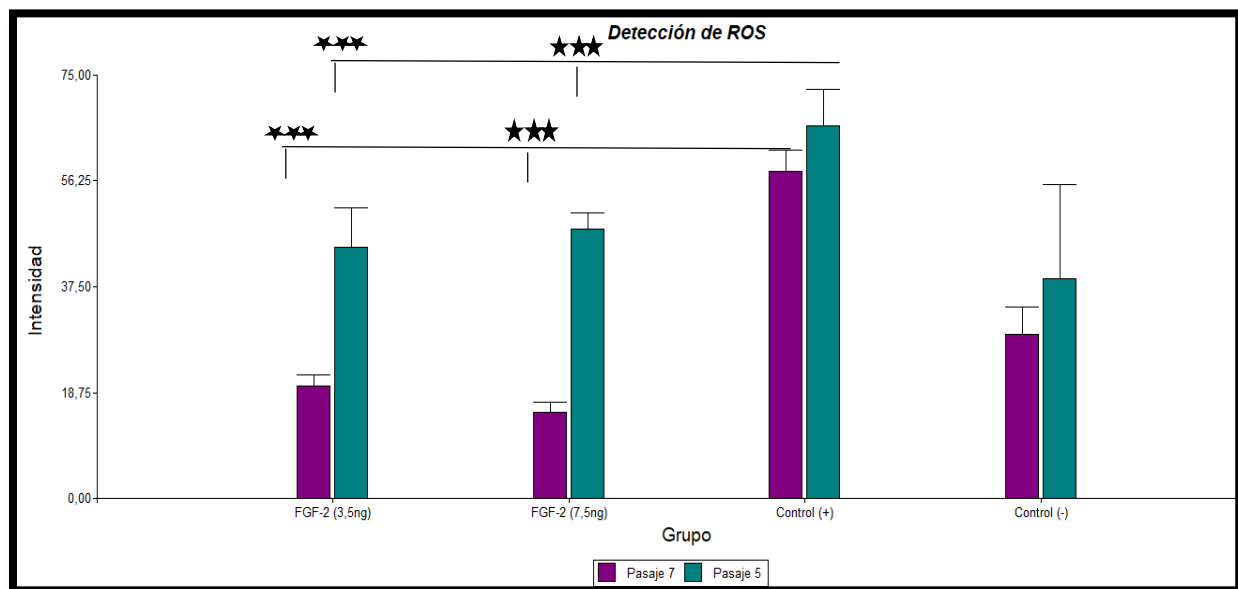
Figura 26. Imagen digitalizada de un cultivo de CMM-gW Estrés Oxidativo de CMM-gW durante pasaje 7.



Fotografías tomadas en Floid™Cell Imaging Station Magnificación: 20X, Barra de escala= 10 µm.

Fuente: Autor

Figura 27. Gráfico de detección de ROS.



En los pasajes 5 y 7 en los distintos grupos experimentales la gráfica de barras corresponde a la intensidad media de fluorescencia emitida por el kit de detección de ROS *Los resultados se muestran de la siguiente manera: Intensidad Celular (ordenadas), Grupo (abscisas), \pm ESM. Los valores de p se obtuvieron comparando el grupo control con cada grupo de tratamiento Diferencias significativas (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

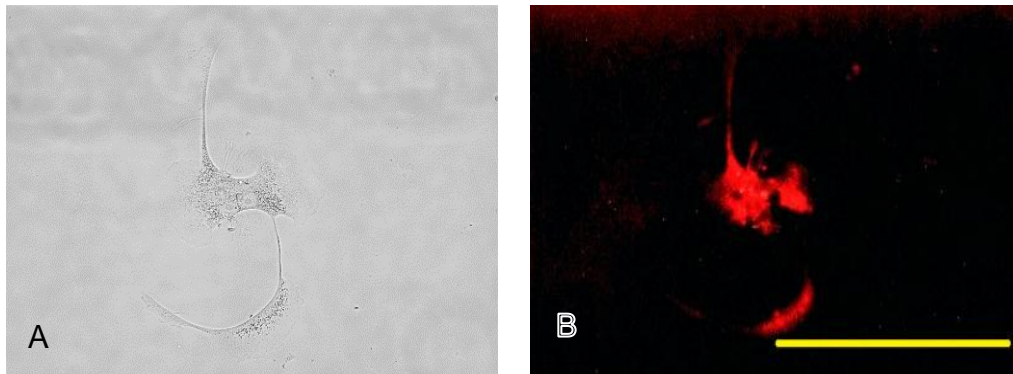
Fuente: Autor

Los datos obtenidos en la detección de ROS en pasaje 5 con una significancia del 99,5%, no evidencian una diferencia significativa ($p = < 0,2544$; H: 17,34) sin embargo, en pasaje 7, los datos obtenidos con una significancia del 99,5%, evidencian diferencias. ($p = < 0,006$; H: 17,34), en especial cuando se compara el control positivo, respecto a los tratamientos.

No siendo un objetivo del proyecto se decidió corroborar esta información, y así tener claridad de que las dosis utilizadas de FGF-2, pese a ser elegidas por una búsqueda de literatura, también eran las más apropiadas, por lo cual se aplicó una dosis de FGF-2 (40ng/ml), (figura 24) A un cultivo de Células Madre mesenquimales de médula ósea de ratón (CMM-MOR), donde inicialmente las células iniciaron un proceso de proliferación, seguido de aumento en el tamaño celular y finalmente la muerte, se considera que a una

dosis mayor, el FGF-2 resulta ser toxico para las CMM, adicionalmente al medir los niveles de intensidad de esta célula, se encontraron que eran bastante altos (90,09), siendo aún más elevados que el control positivo con H_2O_2 (0,2mM) (figura 24).

Figura 28. Fotografías de CMM-MOr después de 7 días de aplicar una dosis de FGF-2 (40ng).



A. Célula con gran tamaño, Fotografía en Luz Blanca. B. Célula positiva para ROS (Intensidad =90.093).
Fotografías tomadas en Flouid™ Cell Imaging Station (20X), Barra de escala= 10 μm

Fuente: Autor

5. DISCUSIÓN

Características como la capacidad proliferativa, regeneración de tejidos y plasticidad fenotípica, han hecho que las CMM-gW, sean postuladas como una fuente potencial, para la terapia regenerativa. Adicionalmente, en los últimos años las CMM-gW han cobrado interés debido a que poseen mayor proliferación que las CM adultas, su extracción es menos compleja, no causa estrés al paciente y se da uso a un órgano considerado anteriormente como desecho biológico (Can et al., 2017; L. Huang et al., 2011; Katsares et al., 2009). Sin embargo, para un trasplante exitoso, es necesario obtener suficiente cantidad de CMM-gW, por lo cual, se cree conveniente una etapa de expansión-*In-vitro*, donde las células son mantenidas en condiciones similares a las de su nicho original, a pesar de ello, su potencial de diferenciación y crecimiento celular se ve comprometido después de un largo tiempo en cultivo, dando lugar a un proceso de detención celular, denominado senescencia (Cui et al., 2017; Drela et al., 2014; Robinson et al., 2011).

EL FGF-2 fue propuesto en este estudio, con la finalidad de promover la proliferación celular y atenuar procesos como la senescencia y el estrés oxidativo; Debido al papel que cumple este factor en la regulación de la mitosis (Dolivo et al., 2016). Por lo cual, se planteó como primer objetivo para el desarrollo del proyecto, evaluar la influencia del FGF-2 en la proliferación y viabilidad celular, donde los resultados obtenidos expusieron un comportamiento decreciente en el porcentaje de células vivas (Fig 5), a medida que aumentan los pasajes o subcultivos celulares. Éste resultado es apoyado por Sarugaser, Lickorish, Baksh, Hosseini, & Davies (2005) quienes demostraron que las CMM-gW tienen una tasa de generación celular decreciente desde que inicia el cultivo, en pasaje 2 hasta pasaje 8, sin embargo, los resultados de este estudio permiten aseverar que el FGF-2 contribuyó en la manutención y supervivencia celular de manera positiva. Puesto que los tratamientos que contenían FGF-2 permitieron que la reducción de la viabilidad se diera de manera moderada.

En el presente estudio la concentración de FGF-2_{7,5 ng} disminuyó el tiempo de muerte celular de las CMM-gW y expuso una mayor tendencia de supervivencia celular, difiriendo de la investigación de Nawrocka, Kornicka, Szydlarska, & Marycz (2017), quienes utilizaron dosis de 5 ng/mL y 10 ng/mL de FGF-2 a un cultivo de CMM, y demostraron que la dosis que contribuyó a la proliferación celular fue la de 5 ng /mL, cabe resaltar que esta es una dosis intermedia a las expuestas en este estudio, no obstante la dosis de FGF-2_{3,5ng} aunque no mostro diferencias significativas respecto al control, si presento un leve aumento de la proliferación celular.

Estos resultados afirman el concepto de que el FGF-2 actúa como una importante citoquina, estimulando la proliferación celular (Hidaka et al., 2012), es pertinente aclarar que las dosis elegidas de FGF-2 en el desarrollo de esta investigación, se tomaron con base a datos obtenidos en estudios anteriores como el reportado por Bianchi et al (2003) sobre el enriquecimiento de un cultivo celular con 1 ng de FGF-2, el cual incrementó gradualmente la formación de telómeros (efecto adverso a lo que ocurre normalmente en la senescencia a nivel in vitro) , y el estudio realizado por Wang et al., (2015), en un cultivo de CMM de panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*), expuesto a tratamientos de FGF-2, (0, 1, 5,10 ng/ml), mostrando una mejor capacidad proliferativa en la dosis de 5 ng/ml, adicionalmente los investigadores apoyaron su estudio, agregando inhibidores de la vía de señalización ERK , demostrando que esta ruta de señalización juega un rol fundamental en la proliferación celular estimulada por el FGF-2. Adicionalmente, Xu et al (2005) sugieren que este factor por si solo o en combinación con otros factores de crecimiento son necesarios para mantener la proliferación celular, además de mantener el cultivo indiferenciado, debido a que los factores paracrinicos secretados por las CMM pierden su funcionalidad en un cultivo a largo plazo.

Un aspecto que aunque no fue planteado como objetivo en la realización del proyecto, pero que se consideró importante, es la viabilidad inicial de las CMM-gW, donde se observó en los pasajes iniciales, el 70%, de células vivas, en el caso del tratamiento sin aplicación del FGF-2 este porcentaje, se mantiene estable hasta pase 4 y es en este pasaje, donde empieza a disminuir progresivamente, mientras que en los tratamientos

donde fue aplicado FGF-2, este porcentaje de viabilidad incremento en pase 4 y vuelve a decrecer paulatinamente en pase 6; esta tendencia, se observa notablemente en el caso del FGF-2 en la dosis de 7,5 ng; por lo cual se podrían postular dos hipótesis:

1) La disminución de la viabilidad celular es dada por causas del proceso de congelación.

A pesar de que la crio preservación es la mejor opción, para la conservación de las CMM-gW a largo plazo, la función y viabilidad celular, se ve afectada después de este proceso. S. Huang et al (2015) analizaron la viabilidad de las CMM-gW aplicando diferentes metodologías de congelación, donde se exhibió un incremento en los niveles de ROS intracelular, en todas las condiciones probadas en comparación con las CMM-gW frescas, esta información se ve corroborada, por un estudio realizado por Lindemann et al (2014) quienes al estudiar los efectos de la crio preservación en CMM de pulpa dentaria, revelaron que el grupo de CMM que fue crio preservado, presentaba alteraciones en su capacidad de proliferación, limitando su aplicación terapéutica, por lo cual el proceso de congelación celular, pudo haber afectado la viabilidad del cultivo, disminuyéndola a tan solo el 70% de células viables en un pasaje temprano.

2) Las CMM-gW presentan inicialmente un periodo de adaptación al cultivo, donde solo un porcentaje de células sobreviven.

Valdivieso (2008), reportó una disminución de la viabilidad celular entre el cultivo primario y el primer pasaje, esta inclinación se siguió manteniendo hasta el tercer pasaje, donde se reportó una estandarización del cultivo y una disminución de la viabilidad en pasaje seis, relacionando de esta manera la baja viabilidad inicial del cultivo de CMM-gW utilizadas en la realización de este estudio, con un proceso de adaptación de las células al cultivo.

Este estudio es corroborado por Kuilman Thomas, Michaloglou Cheysiis, (2010) quienes afirman que las células primarias, no crecen indefinidamente y por lo contrario su capacidad proliferativa a nivel in vitro se ve caracterizada por presentar 3 fases: Fase1,

corresponde a un periodo de poca proliferación, tiempo en el que el cultivo se establece, Fase 2, el cultivo presenta una rápida proliferación, Fase 3, durante el cual disminuye gradualmente la proliferación celular hasta detenerse por completo. Estos reportes apoyan los datos obtenidos, la realización del proyecto, donde la viabilidad inicial fue del 70%, en los pasajes siguientes presento un incremento en la proliferación celular y finalmente el cultivo exhibió una fase de disminución en la proliferación del cultivo.

Respecto a la viabilidad de núcleos, se estimó un efecto positivo del FGF-2 en las dos dosis, en relación al control negativo, debido a que los tratamientos con FGF-2 conservaron estable el porcentaje de núcleos sin daño, caso contrario a lo que sucedió en el control negativo donde se observó una disminución del porcentaje de núcleos sin daños en el pasaje 7, igualmente aunque de manera no significativa se presentan tanto en el control negativo como en los tratamientos de FGF-2 un porcentaje de núcleos dañados por condensación superior a los núcleos dañados por fragmentación, este resultado se ve confirmado por estudios que señalan como característica representativa de células senescentes la presencia de núcleos condensados, debido a que las células a pesar de experimentar una detención irreversible del crecimiento, continúan siendo metabólicamente activas y acumulan focos de ADN dañado, conformando una estructura de heterocromatina distinta, denominada focos de heterocromatina (Diaz, Norma Edith, Martinez Garduño, & Fainstein, 2005; Turinetti et al., 2016).

Otro aspecto que se tuvo en cuenta en este estudio fue la inmunofenotipificación, este es un procedimiento necesario para la caracterización de las CMM-gW, que permite ratificar que las células evaluadas pertenecen al linaje mesenquimal y no han sido contaminadas con células del linaje hematopoyético, aspectos considerados importantes para aplicar pruebas en fase 5 y fase 7, de los cuales se obtuvo que en los dos pasajes las células presentaron marcación positiva para CD44-CD29-CD90 marcadores de superficie presentes en CMM-gW y negativa para CD45 marcador específico de membrana de CMH (Koh et al., 2008). Sin embargo en el pasaje 5, se encontró una pequeña población de linaje hematopoyético, no superior al 25% de las células totales, podría entenderse este resultado, mediante reportes que indican la presencia de una pequeña cantidad de

células hematopoyéticas (0,00003%) en el cordón umbilical, sin embargo esta cantidad, es inferior a otras fuentes de obtención como la médula ósea (Ziaei et al., 2017) otros estudios, han identificado esta misma población mediante citometría de flujo, reportando que estas células al igual que en la médula ósea son un contaminante común del cultivo (Drela et al., 2014). No obstante Guerrero, Romero, Marcela, & Pardo, (2007) exponen que al realizar pases consecutivos de cultivo, se va purificando la población de CMM, y al realizar la caracterización inmunofenotípica, en pasaje 7, se logra descartar la presencia de CMM de origen hematopoyético, caso similar a lo ocurrido en la realización de este proyecto, donde se identificó una pequeña población de linaje hematopoyético en pasaje 5 que desapareció en su totalidad en pasaje 7.

Resaltando el enfoque de esta investigación, que relaciona el papel proliferativo y anti senescente del FGF-2, se confirmó que las CMM-gW al igual que otros cultivos celulares, después de un largo tiempo *in-vitro*, entran en un estado de senescencia celular o límite de Hayflick (Meng et al., 2017), el cual es demostrado en este proyecto, mediante un aumento en la producción de la enzima β -galactosidasa en el pasaje 7, lo cual es interpretado como un mayor porcentaje de células senescentes (Fig18), en concordancia con los estudios realizados por Guerrero et al., (2007) donde concluyen que el número de pases realizados en los cultivos celulares es proporcional a la senescencia presente en las células. Cabe resaltar que la producción de la enzima β -galactosidasa también se evaluó en el pasaje 5, donde el control negativo no presentó diferencias significativas respecto a los tratamientos, por lo cual se resalta un papel positivo del FGF-2 tanto en la dosis de 3,5 ng como en la de 7,5 ng y se destaca, un menor porcentaje de células senescentes en el tratamiento de FGF-2 7,5ng, (Fig. 17; Fig. 18), este resultado es soportado por Ito et al., (2007) quienes investigaron la estimulación del FGF-2 en un cultivo de CMM y detectaron que a los 10 días de aplicado el tratamiento, el cultivo que presentaba FGF-2, al día 50 presentaba el 40% de células senescentes, no obstante, en los tratamientos control (en ausencia de FGF-2) el porcentaje de células senescentes a los 10 días era de 20.5% y a los 50 días, este porcentaje había incrementado al 57,6%.

Igualmente se consideró un factor importante el área teñida por el reactivo x-gal, puesto que la producción de la enzima de β -galactosidasa es dada por un aumento de lisosomas en la célula, sin embargo, al medir el área celular teñida, no se observaron diferencias significativas tanto en tratamientos, como controles, tampoco se halló una diferencia significativa entre pasajes, por el contrario, se encontró un aumento del área celular de total de las células evaluadas en pasaje 7, esta característica, confirma el aspecto senescente del cultivo, teniendo en cuenta que una de las características de las células en estado de senescencia es el aumento en el tamaño celular (Feng, 2012).

Estos resultados, son apoyados por estudios realizados por Tovar Fernández (2013), quien encontró atrociitos senescentes, desde pasaje 2 hasta pasaje 8, los cuales se reconocían por presentar un incremento en el tamaño celular y un mayor número de células teñidas con β -Galactosidasa a medida que aumentaba el pasaje, por otro lado Lerma Hernández (2012), sugiere que la actividad de la enzima, β -Galactosidasa se ve disminuida durante la proliferación y solo se detecta cuando hay inducción a senescencia, por lo cual se infiere que el aumento de vesículas lisosomales, productoras de esta enzima son originadas por una acumulación de macromoléculas como proteínas, lípidos, RNA y DNA, que afectan las condiciones celulares, otros autores reportan que los cambios morfológicos asociados a senescencia, pueden estar asociados también con un posible bloqueo en la división celular, dada por el acortamiento de telómeros, y la activación de genes como el P53 (Lerma Hernández, 2012), también, se referencia, que la senescencia celular se ve mediada por dos inhibidores quinasas (p21 y p16) los cuales son dependientes de ciclinas y que a pesar de que la célula se encuentre en un estado de senescencia, esta puede permanecer activa durante un largo tiempo, liberando proteasas y componentes insolubles, los cuales pueden modificar el microambiente, afectando así a otras células (Fridlyanskaya, Alekseenko, & Nikolsky, 2015), por lo cual en este estudio se puede tener como alternativa, que estas moléculas pueden inducir un aumento en la senescencia de las células no tratadas con FGF.2 y de alguna forma, este factor de crecimiento logró atenuar el proceso de senescencia celular, prolongando el tiempo de vida de las células.

El efecto del FGF-2 de reducir el efecto senescente en el cultivo, es apoyado por (Galderisi et al., 2013), quienes demostraron que a pesar que la senescencia incrementa en los pasajes celulares, los cultivos que fueron tratados con FGF-2 mostraron un aumento más bajo que el control al cual no se le habían adicionado factores.

Dentro de los objetivos evaluados, se estimó la presencia de especies reactivas de oxígeno, debido a que La senescencia celular puede ser originada por acortamiento y disfunción de los telómeros, la cual es denominada senescencia replicativa, o puede ser causada por daños en el ADN causado por estrés celular, la cual es denominada senescencia prematura y es independiente a la longitud de los telómeros (Mirzayans, Andrais, Hansen, & Murray, 2012), adicionalmente el estrés oxidativo dado por altas dosis de ROS intracelular, representa una pérdida de la capacidad proliferativa de las CMM (Fridlyanskaya et al., 2015). A nivel *in-vivo*, este proceso es balanceado y regulado por enzimas como la superoxido dismutasa, la cual realiza una correcta eliminación de ROS y evita la acumulación excesiva de estas especies. (Denu & Hematti, 2016). No obstante, a nivel *in-vitro* los factores de estrés celular aumentan, debido a los cambios en el ambiente, originando daños irreversibles en ADN, proteínas y matriz celular, por consiguiente se da lugar al proceso de senescencia replicativa (Liu et al., 2016). Adicionalmente, se resalta la importancia de evaluar ROS en CMM, debido a la pérdida de funciones inmunomoduladoras y de diferenciación celular que estas células presentan después de ser cultivadas a nivel *in-vitro*, dado posiblemente al aumento de ROS, algunos autores reportan que las CMM son más susceptibles al estrés oxidativo, debido a que cuentan con pocos antioxidantes que contribuyan a la regulación de ROS (Denu & Hematti, 2016).

Por lo anterior, la disminución de la producción de ROS causado por un efecto positivo de FGF-2 en las CMM-gW, evidencia que este factor no solo contribuye al mantenimiento del cultivo, sino que también promueve la regulación de ROS Intracelular, dado a que los resultados obtenidos, señalan que en pasaje 5, la diferencia presente entre los tratamientos con FGF-2 y los controles, aunque visualmente era notoria, estadísticamente no presentó significancia, sin embargo en pasaje 7, esta diferencia en

la producción de ROS, los tratamientos de FGF-2 demostraron una diferencia significativa respecto al control positivo, con significancia del 99,5% ($p=0,006$; $H=17,34$). (Anexo G) (Figuras 22 y 23).

Cabe resaltar que la presencia de ROS en los cultivos tratados con FGF-2, en los pasajes evaluados, no necesariamente devengue un efecto negativo, por el contrario, los ROS juegan un rol importante en la señalización celular (Ko, Lee, & Hwang, 2012), siempre y cuando se encuentre en niveles bajos ($<10\mu\text{M}$). Sin embargo, cuando las células son expuestas a concentraciones mayores de ROS, ($>200\mu\text{M}$) se induce a muerte celular por apoptosis y cuando se encuentran entre ($100\text{-}200\mu\text{M}$) las células presentan características propias de células senescentes (Brandl et al., 2011). Lo cual despierta el interés de complementar este resultado, para futuros estudios, mediante la realización de un análisis cuantitativo en donde se detecten los niveles de ROS para cada pasaje y cada tratamiento. Choo et al (2014) reportaron que la utilización de concentraciones subletales de H_2O_2 (Aproximadamente $150\mu\text{M}$) inducen características similares a la senescencia en las CMM-gW, adicionalmente reportan que estas células son altamente sensibles al estrés oxidativo en comparación con otros tipos de CMM debido a la reducción de las actividades de las enzimas antioxidantes, incluso, se ha reportado que al ser inducidas con H_2O_2 , muestran una mayor acumulación de ROS que células cancerígenas y fibroblastos humanos. (Ko et al., 2012)

Sin embargo, la adición exógena de antioxidantes, puede restaurar la resistencia celular del estrés. Corroborando esta información con el presente estudio, se podría plantear, que el FGF-2 actúa como factor antioxidante reduciendo la concentración de H_2O_2 y por ende el estado de senescencia celular. Sin embargo para corroborar esta hipótesis, es necesario realizar un estudio de señalización de vías celulares. No obstante, investigadores como Preda, Rosca, Tutuianu, & Burlacu (2015), quienes cultivaron CMM con medio suplementado de factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFB1) (10ng/ml), Factor de crecimiento insulínico tipo 1 IGF (50ng/mL) y FGF-2 (50ng/mL) contrastan los resultados obtenidos en este proyecto, demostrando que la aplicación únicamente del FGF-2 a pesar de promover un aumento en la proliferación celular,

formulan que este factor es citotóxico, debido a que produce un colapso en el índice celular. A pesar de esta afirmación, en este estudio se determinó que a bajas dosis de FGF-2 como las utilizadas (3,5ng y 7,5ng), el FGF-2, promueve la proliferación celular y disminuye la senescencia replicativa, sin causar efectos adversos al cultivo. Por lo cual se concluye que la concentración utilizada del FGF-2 es clave en el momento de su aplicación en el cultivo.

Por lo tanto la realización de este proyecto permitió identificar el rol que presenta el FGF-2, en el cultivo de CMM-gW, al atenuar de manera moderada el efecto de la senescencia celular, por medio de una regulación de la proliferación celular y el estrés oxidativo, sin embargo es necesario realizar un marcaje de proteínas, en cada pasaje para corroborar la vía de señalización por la cual actúa directamente este factor en las CMM-gW, aun así, tomando hipótesis de diferentes estudios, se puede inferir que este factor conduce a la fosforilación y activación de la vía ERK, y por ende la activación de la vía MAP quinasa (Eom et al., 2014; Ito et al., 2007), y que la disminución de la senescencia celular por medio del FGF-2 y su papel clave en la regeneración celular podría ser dada a través de la vía de señalización PI3K / AKT-MDM2 (Nawrocka et al., 2017). Otros estudios postulan que el FGF-2 presenta un efecto en la disminución, de la proteína P16 la cual se caracteriza por su capacidad de detener el ciclo celular de fase G1 a fase S, regulando de manera negativa la proteína P53 que es responsable de mediar respuestas de daño de ADN (Galderisi et al., 2013; Mirzayans et al., 2012). Otros estudios, relacionan al FGF-2 y su actividad antioxidante con la capacidad de inducir la actividad de enzimas antioxidantes (Galderisi et al., 2013). Sin embargo estos resultados son hipotéticos, y se busca realizar a futuro una investigación que permita detectar las moléculas y vías de señalización que se ven implicadas por la acción del FGF-2 en la manutención celular de las CMM-gW.

6. CONCLUSIONES

- a. La viabilidad celular, disminuye progresivamente con cada pasaje, sin embargo el FGF-2 en las dos dosis utilizadas contribuye a reducir este proceso, resaltando la dosis de FG-2 7,5ng que contribuye a mitigar los procesos biológicos celulares como la muerte y senescencia celular.
- b. La señalización de núcleos, permitió identificar que células senescentes presentan como característica, núcleos condensados, debido a la formación de heterocromatina y a la concentración de ADN sin reparar.
- c. Las CMM aisladas de gW, cumplieron con los criterios establecidos por la ISCT, como lo son, la adherencia al plástico y la caracterización, inmunofenotípica para CMM, CD44, C90 Y CD29 positivos y CD45 negativos. Por lo tanto el FGF-2 en las dosis utilizadas, no promueve a un fenotipo hematopoyético. El fenotipo hematopoyético encontrado en bajo porcentaje en pasaje 5, se va eliminando, con los pasajes consecutivos, obteniendo un cultivo totalmente mesenquimal en pasaje 7.
- d. La senescencia celular, es proporcional al número de pases que se realice en el cultivo, en pasaje 5, es del 50 % sin embargo este porcentaje no varió significativamente en pasaje 7, por lo que se requiere hacer un mayor número de pasajes para determinar la senescencia total del cultivo, destacando la importancia de la B-galactosidasa, que resultó ser un marcador óptimo para la determinación e identificación de células senescente.
- e. La presencia de FGF-2 en las dosis utilizadas, contribuye positivamente a disminuir la senescencia celular en el cultivo, retardando este proceso, la dosis de factor que obtuvo, una mayor proliferación celular y poco aumento de células senescentes fue la de 7,5 ng.

- f. Las moléculas de ROS se encuentran relacionadas con el estado de senescencia celular, debido a que estas incrementan consecutivamente con el aumento de pasajes.
- g. El FGF-2 en las dos dosis utilizadas, presentó un efecto positivo en la disminución de ROS y senescencia celular, sin embargo, aunque el FGF-2 puede prolongar el tiempo de cultivo, este estado de detención del ciclo celular, es inevitable en el cultivo
- h. La dosis de FGF-2 7,5ng demostró reducir significativamente los ROS presentes en el cultivo y atenuó el proceso de senescencia celular.

RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso de FGF-2 en dosis ya sea de 3,5 o 7,5 ng en CMM-gW para optimizar el cultivo celular, mitigando el proceso de senescencia celular.

Realizar estudios pertinentes de congelación y descongelación de CMM-gW y determinar si este es un factor relevante en su utilización en terapia regenerativa, en pro de mejorar el mantenimiento y conservación de estas células en cultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abcam. (2016). Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (Orange Fluorescence),(December).Retrieved from <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.92.20.9363>
- Agnieszka dudka, A. (2009). *Identification of novel components in fibroblast growth factor signalling*. University of Birmingham.
- Andrea, J., Romero, A., Marcela, D., Guerrero, P., Marcela, V., & Pardo, R. (2007). Células madre mesenquimales : características biológicas y aplicaciones clínicas . *Redalycuaemexmx*, 5, 177–184. Retrieved from <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/411/41150809.pdf>
- Apel, A., Groth, A., Schlesinger, S., Bruns, H., Schemmer, P., Büchler, M. W., & Herr, I. (2009). Suitability of human mesenchymal stem cells for gene therapy depends on the expansion medium. *Experimental Cell Research*, 315(3), 498–507. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.11.013>
- Araos Graterol, C. (2009). *Cultivo de células madre mesenquimales del cordón umbilical humano, potencialidad osteo-condrogenica “in vitro”*. UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA.
- Baker, N., Boyette, L. B., & Tuan, R. S. (2015). Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone*, 70, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.10.014>
- Baksh, D., Yao, R., & Tuan, R. S. (2007). Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. *Stem Cells*, 25(6), 1384–1392.

<https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0709>

Bay, C. W., Kong, H., & Tang, B. Z. (2011). Senescence Associated β -galactosidase Staining. *Bio-Protocol*, 2, 1–18. Retrieved from <http://www.bio-protocol.org/e247>

Bellusci, S. (2015). Ac ce p te d t. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.10.009>

Benito de las Heras, M. (2003). Senescencia replicativa y telomerasa. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Bianchi, G., Banfi, A., Mastrogiacomo, M., Notaro, R., Luzzatto, L., Cancedda, R., & Quarto, R. (2003a). Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Experimental Cell Research*, 287(1), 98–105.

Bianchi, G., Banfi, A., Mastrogiacomo, M., Notaro, R., Luzzatto, L., Cancedda, R., & Quarto, R. (2003b). Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Experimental Cell Research*, 287, 98–105. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(03\)00138-1](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00138-1)

Brandl, A., Meyer, M., Bechmann, V., Nerlich, M., & Angele, P. (2011). Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*, 317(11), 1541–1547.

Brizuela, C. et al. (2013). Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Folículo Dentario Humano. *Int. J. Morphol. [Online]*, 31(2), 739–746. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022013000200063>

Bydlowski, S. P., Debes, A. A., Maselli, L. M. F., & Janz, F. L. (2009). Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia*, 31, 25–35. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000038>

- Can, A., Celikkan, F. T., & Cinar, O. (2017). Umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantations: A systemic analysis of clinical trials. *Cytotherapy*, (August). <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.08.004>
- Carpes, S. T., Cabral, I. S. R., Luz, C. F. P., Capeletti, J. P., Alencar, S. M., & Masson, M. L. (2009). Palynological and physicochemical characterization of *Apis mellifera* L. bee pollen in the Southern region of Brazil. *Journal of Food Agriculture Environment*, 7, 667–673.
- Carvalho, P. H., Daibert, A. P. F., Monteiro, B. S., Okano, B. S., Carvalho, J. L., Cunha, D. N. Q. Da, ... Del Carlo, R. J. (2013). Differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 100(1), 82–89. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2012005000114>
- Castellà Fernández, E. (2005). *Estudio de la expresión de CD44 en procesos preneoplásicos y neoplásicos de esófago, estómago y páncreas*. Universidad Autonoma de Barcelona. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/4227>
- Choo, K. B. un., Tai, L., Hymavathee, K. S., Wong, C. Y. i., Nguyen, P. N. guye. N., Huang, C. J., ... Kamarul, T. (2014). Oxidative stress-induced premature senescence in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *International Journal of Medical Sciences*, 11(11), 1201–1207. <https://doi.org/10.7150/ijms.8356>
- Chuaire-Noack, L., García-Morcote, C., & Ramírez-Clavijo, S. R. (2011). Actividad β -galactosidasa asociada con la senescencia en fibroblastos del estroma ovárico in vitro. *Revista Ciencias de La Salud*, 9(1), 17–31.
- Cortes Tique, J. P. (2011). *Caracterización del ciclo de vida de un cultivo de células madre mesenquimales (MSCs) aisladas de lipoaspirado y determinación de sus cambios fisiológicos asociados a senescencia*. Pontificia Universidad Javeriana.

- Cui, Y. B., Ma, S. S., Zhang, C. Y., Cao, W., Liu, M., Li, D. P., ... Guan, F. X. (2017). Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis. *Behavioural Brain Research*, 320, 291–301. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.12.021>
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119, 2204–2213. <https://doi.org/10.1242/jcs.02932>
- de Jesus, B. B., & Blasco, M. A. (2012). Assessing cell and organ senescence biomarkers. *Circulation Research*, 111(1), 97–109. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.247866>
- de Mattos Carvalho, A., Alves, a. L. G., Golim, M. A., Moroz, A., Hussni, C. A., de Oliveira, P. G. G., & Deffune, E. (2009). Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132(2–4), 303–306. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.06.014>
- Del Nogal -Avila, M. (2012). *Mecanismos de senescencia en células mesangiales humanas en la diabetes y el envejecimiento*.
- Denu, R. A., & Hematti, P. (2016). Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2989076>
- Diaz, L., Norma Edith, Martinez Garduño, C. M., & Fainstein, M. (2005). LA SENESCENCIA REPLICATIVA COMO UNA RESPUESTA CELULAR AL ESTRÉS. *Reb*, 24(2), 47–53.

- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., ... Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9363–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>
- Dolivo, D., Hernandez, S., & Dominko, T. (2016). Cellular lifespan and senescence: a complex balance between multiple cellular pathways. *BioEssays*, 38, S33–S44. <https://doi.org/10.1002/bies.201670906>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. ., Krause, D. S., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Donnelly, J. M., Engevik, A., Feng, R., Xiao, C., Boivin, G. P., Li, J., ... Zavros, Y. (2014). Mesenchymal stem cells induce epithelial proliferation within the inflamed stomach. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 306(513), G1075-88. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00489.2012>
- Drela, K., Sarnowska, A., Siedlecka, P., Szablowska-Gadomska, I., Wielgos, M., Jurga, M., ... Domanska-Janik, K. (2014). Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. *Cytotherapy*, 16(7), 881–892. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.02.009>
- Ennis, J., Sarugaser, R., Gomez, A., Baksh, D., & Davies, J. E. (2008). Isolation, Characterization, and Differentiation of Human Umbilical Cord Perivascular Cells (HUCPVCs). *Methods in Cell Biology*, 86(8), 121–136. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)00007-1)

- Eom, Y. W., Oh, J.-E., Lee, J. I., Baik, S. K., Rhee, K.-J., Shin, H. C., ... Shim, K. Y. (2014). The role of growth factors in maintenance of stemness in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445(1), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.084>
- Espinoza, F., & Aliaga, F. (2016). Escenario actual y perspectivas de la terapia con células madre mesenquimales en medicina intensiva. *Rev Med Chile*, 144, 222–231.
- Feng, G. (2012). Mesenchymal Stem Cells and Senescence. *Cloning & Transgenesis*, 2(1), 2–5. <https://doi.org/10.4172/2168-9849.1000104>
- Fernandes-freitas, I., & Owen, B. M. (2015). ScienceDirect Metabolic roles of endocrine fibroblast growth factors. *Current Opinion in Pharmacology*, 25, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.09.014>
- Flores-figueroa, E., Montesinos, J. J., & Mayani, H. (2006). Células troncales mesenquimales : historia , biología y aplicación clínica, 58(5), 498–511.
- Fridlyanskaya, I., Alekseenko, L., & Nikolsky, N. (2015). Senescence as a general cellular response to stress: A mini-review. *Experimental Gerontology*, 72, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.09.021>
- Fuentes Lacouture, M. F. (2008). Optimización del Sistema de Cultivo y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Obtenidas a partir de Medula Osea Humana.
- García, S. R. (2015). Células madre: Potencial asombroso, desafiante demanda. *Vox Juris*, 28(2), 189–223. Retrieved from <http://www.aulavirtualusmp.pe/ojs/index.php/VJ/article/view/15>
- Guerrero, D. P., Romero, J. A., Marcela, V., & Pardo, R. (2007). Evaluación de características morfológicas e inmunofenotipo de células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea . *Nova*, 5(8),

114–126.

Hernández-ramírez, P., & Forrellat-barrios, M. (2013). Ventajas de la terapia celular con células mononucleares derivadas de la médula ósea , aplicadas en su conjunto
Advantages of cell therapy with bone marrow derived mononuclear cells using the entire mononuclear fraction, *29*(4), 407–412.

Hidaka, T., Nagasawa, T., Shirai, K., Kado, T., & Furuichi, Y. (2012). FGF-2 induces proliferation of human periodontal ligament cells and maintains differentiation potentials of STRO-1+/CD146+ periodontal ligament cells. *Archives of Oral Biology*, *57*(6), 830–840. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.12.003>

Huang, L., Wong, Y.-P., Gu, H., Cai, Y.-J., Ho, Y., Wang, C.-C., ... Burd, A. (2011). Stem cell-like properties of human umbilical cord lining epithelial cells and the potential for epidermal reconstitution. *Cytotherapy*, *13*(2), 145–155. <https://doi.org/10.3109/14653249.2010.509578>

Huang, S., Xu, L., Sun, Y., Wu, T., Wang, K., & Li, G. (2015). An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Journal of Orthopaedic Translation*, *3*(1), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2014.07.005>

Ito, T., Sawada, R., Fujiwara, Y., Seyama, Y., & Tsuchiya, T. (2007a). FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF- β 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *359*(1), 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.067>

Ito, T., Sawada, R., Fujiwara, Y., Seyama, Y., & Tsuchiya, T. (2007b). FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF- β 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *359*, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.067>

- Jaimes-Parra, B. D. (2014). Microscopic evaluation of transdifferentiation of Wharton's jelly stem cells to urothelium. *Actualidad Medica*, 99(793), 132–135. <https://doi.org/10.15568/am.2014.793.or03>
- Kabiri, A., Esfandiari, E., Hashemibeni, B., Kazemi, M., Mardani, M., & Esmaeili, A. (2012). Effects of FGF-2 on human adipose tissue derived adult stem cells morphology and chondrogenesis enhancement in Transwell culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 424(2), 234–238. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.06.082>
- Katsares, V., Petsa, a., Felesakis, a., Paparidis, Z., Nikolaidou, E., Gargani, S., ... Grigoriadis, J. (2009). A Rapid and Accurate Method for the Stem Cell Viability Evaluation: The Case of the Thawed Umbilical Cord Blood. *Laboratory Medicine*, 40(9), 557–560. <https://doi.org/10.1309/LMLE8BVHYWCT82CL>
- Kobolak, J., Dinnyes, A., Memic, A., Khademhosseini, A., & Mobasher, A. (2016). Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*, 99, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.016>
- Koh, S. H., Kim, K. S., Choi, M. R., Jung, K. H., Park, K. S., Chai, Y. G., ... Kim, S. H. (2008). Implantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a neuroprotective therapy for ischemic stroke in rats. *Brain Research*, 1229, 233–248. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.06.087>
- Kolf, C. M., Cho, E., & Tuan, R. S. (2007). Biology of adult mesenchymal stem cells : regulation of niche , self-renewal and differentiation MSC markers, 10, 1–10. <https://doi.org/10.1186/ar2116>
- Kottakis, F., Polytaichou, C., Foltopoulou, P., Sanidas, I., Kampranis, S. C., & Tsiachlis, P.

- N. (2011). FGF-2 Regulates Cell Proliferation, Migration, and Angiogenesis through an NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 Pathway. *Molecular Cell*, 43(2), 285–298. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.020>
- Kuilman Thomas, Michaloglou Cheysiis, M. W. (2010). The essence of senescence. *Health & Social Care in the Community*, 11(5), 423–430. <https://doi.org/10.1136/bmj.329.7473.991>
- Lakshmipathy, U., & Verfaillie, C. (2005). Stem cell plasticity. *Blood Reviews*, 19(1), 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2004.03.001>
- Lee, T. (2012). Bone marrow mesenchymal progenitor and stem cell biology and therapy. *Progenitor and Stem Cell Technologies and Therapies*, 345–390. <https://doi.org/10.1533/9780857096074.3.345>
- Lerma Hernandez, L. A. (2012). Caracterización del envejecimiento in vitro de células madre mesenquimales.
- Lilian Chuaire-Noack, Cristian García-Morcote, S. R. R.-C. (2014). Actividad β -galactosidasa asociada con la senescencia en fibroblastos del estroma ovárico in vitro. *Revista Especializada En Ciencias de La Salud*, 2(* Laboratorio de Oncología Molecular. Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer.), 17(2):98-107.
- Lindemann, D., Werle, S. B., Steffens, D., Garcia-Godoy, F., Pranke, P., & Casagrande, L. (2014). Effects of cryopreservation on the characteristics of dental pulp stem cells of intact deciduous teeth. *Archives of Oral Biology*, 59(9), 970–976. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.04.008>
- Liu, X., Zhou, L., Chen, X., Liu, T., Pan, G., Cui, W., ... He, F. (2016). Culturing on decellularized extracellular matrix enhances antioxidant properties of human

- umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Materials Science and Engineering C*, 61, 437–448. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.090>
- Lodi, Daniele ; Iannitti Tommaso; Palmieri, B. (2011). Stem cells in clinical practice: Applications and warnings. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 30(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-9>
- Lopez, M. P. (2015). *Uso autólogo de Celulas madre mesenquimales aisladas de medula ósea para el tratamiento de lesiones osteocondriales: Revisión de protocolos y metodos de criopreservación*. Pontifica Universidad Javeriana.
- Lu, W. Y., & Zhao, M. F. (2012). [Effect of oxidative stress on bone marrow mesenchymal stem cells]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 34(1), 90–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22737723>
- Machado, A. K., Cadoná, F. C., Azzolin, V. F., Dornelles, E. B., Barbisan, F., Ribeiro, E. E., ... da Cruz, I. B. M. (2015). Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. *Food Research International*, 67, 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.056>
- Macías-Abraham, C., Del Valle-Pérez, L. O., Hernández-Ramírez, P., & Ballester-Santovenia, J. M. (2010). Características fenotípicas y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología Y Hemoterapia*, 26(4), 256–275.
- Mafi, P., Mafi, R., Hindocha, S., & Khan, W. S. (2011). Adult Mesenchymal Stem Cells and Cell Surface Characterization - A Systematic Review of the Literature. *The Open Orthopaedics Journal*, 5, 253–260. <https://doi.org/10.2174/1874325001105010253>
- María, M.-G. J. (2012). *Células mesenquimales derivadas del tejido adiposo y de la*

medula ósea: comparación de protocolos de aislamiento y cultivo in-vitro.
Universidad Complutense de Madrid.

Marín, Á. M. J. (2002). Caracterización molecular de las integrinas beta-1 (Cd29) y beta-3 (Cd61) porcinas . Obtención de anticuerpos contra dominios específicos de ambas moléculas., 1, 167.

Markan, K. R., & Potthoff, M. J. (2015). *Metabolic Fibroblast Growth Factors (FGFs): Mediators of Energy Homeostasis. Seminars in Cell and Developmental Biology.* Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.09.021>

Meng, X., Xue, M., Xu, P., Hu, F., Sun, B., & Xiao, Z. (2017). MicroRNA profiling analysis revealed different cellular senescence mechanisms in human mesenchymal stem cells derived from different origin. *Genomics*, 109(3–4), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.02.003>

Mitsiadis, T. A., Barrandon, O., Rochat, A., Barrandon, Y., & De Bari, C. (2007). Stem cell niches in mammals. *Experimental Cell Research*, 313(16), 3377–3385. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.07.027>

Mohammadi, M., Mohammadi, M., Rezaee, M. A., Ghadimi, T., Abolhasani, M., & Rahmani, M. R. (2018). Effect of gestational age on migration ability of the human umbilical cord vein mesenchymal stem cells. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.08.002>

Naugler, W. E., Tarlow, B. D., Fedorov, L. M., Taylor, M., Pelz, C., Li, B., ... Darnell, L. B. (2015). *Fibroblast Growth Factor Signaling Controls Liver Size in Mice With Humanized Livers.* *Gastroenterology.* Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.043>

Nawrocka, D., Kornicka, K., Szydlarska, J., & Marycz, K. (2017). Basic Fibroblast Growth

Factor Inhibits Apoptosis and Promotes Proliferation of Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Isolated from Patients with Type 2 Diabetes by Reducing Cellular Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 3027109. <https://doi.org/10.1155/2017/3027109>

Ortega Rojas, C. C. (2014). Aislamiento y caracterización morfológica de células madre mesenquimales de Raton Balb/c. Universidad del Tolima.

Parekkadan, B., & Milwid, J. M. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 12, 87–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-070909-105309>

Park, J. H., Hwang, I., Hwang, S. H., Han, H., & Ha, H. (2012). Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells prevent diabetic renal injury through paracrine action. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 98(3), 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2012.09.034>

Pountos, I., Corscadden, D., Emery, P., & Giannoudis, P. V. (2007). Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury*, 38 Suppl 4, S23-33. [https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(08\)70006-8](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(08)70006-8)

Preda, M. B., Rosca, A. M., Tutuianu, R., & Burlacu, A. (2015). Pre-stimulation with FGF-2 increases in vitro functional coupling of mesenchymal stem cells with cardiac cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464(2), 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.055>

Prósper, F., Gavira, J. J., Herreros, J., Luquin, G. R. R., Moreno, J., & Robles, J. E. (2006). Trasplante celular y terapia regenerativa con células madre Cell transplant and regenerative therapy with stem cells, 29.

Qiao, C., Xu, W., Zhu, W., Hu, J., Qian, H., Yin, Q., ... Chen, Y. (2008). Human

mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biology International*, 32(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.08.002>

Robinson, S. N., Simmons, P. J., Yang, H., Alousi, A. M., Marcos De Lima, J., & Shpall, E. J. (2011). Mesenchymal stem cells in ex vivo cord blood expansion. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, 24(1), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2010.11.001>

Rodrigues, M., Griffith, L. G., & Wells, A. (2010). Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(4), 32. <https://doi.org/10.1186/scrt32>

Roobrouck, V. D., Ulloa-montoya, F., & Verfaillie, C. M. (2008). Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells, 4(3). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.03.006>

Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M. M., & Davies, J. E. (2005). Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells*, 23(2), 220–229. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0166>

Scadden, D. T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441(7097), 1075–1079.

Schnitzler, A. C., Verma, A., Kehoe, D. E., Jing, D., Murrell, J. R., Der, K. A., ... Rook, M. S. (2016). Bioprocessing of human mesenchymal stem/stromal cells for therapeutic use: Current technologies and challenges. *Biochemical Engineering Journal*, 108, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.08.014>

Sethe, S., Scutt, A., & Stolzing, A. (2006). Aging of mesenchymal stem cells, 5, 91–116. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.10.001>



- Socarrás-ferrer, B. B., Del Valle-Pérez, L. O., Marsan-Suarez, V., Sanchez Segura, M., & Macias-Abraham C. (2013). Células madre mesenquimales : aspectos relevantes y aplicación clínica en la medicina regenerativa Mesenchymal stem cells : relevant aspects and clinical applications in regenerative medicine, 29(1), 16–23.
- Souza, L. M. de. (2011). *Avaliação da indução de senescência e apoptose pelo tratamento com antraciclinas em fibroblastos humanos deficientes no reparo por excisão de nucleotídeos*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Tobin, L. M., & Sc, B. (2012). Immune Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Acute Graft versus Host Disease By, (February).
- Tovar Fernandez, M. camila. (2013). *El envejecimiento en Astrocitos*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Tower, J. (2012). Stress and stem cells. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(6), 789–802.
- Turinetto, V., Vitale, E., & Giachino, C. (2016). Senescence in human mesenchymal stem cells: Functional changes and implications in stem cell-based therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms17071164>
- Valdivieso, A. (2008). *Evaluación Genética Y Microanalítica De Las Células Madre De La Gelatina De Wharton Para Su Utilización En Ingeniería Tisular*. Universidad de Granada. Retrieved from <https://hera.ugr.es/tesisugr/1768058x.pdf>
- Vico Avalos Manuel. (2009). *Evaluacion de la viabilidad y caracterizacion genetica de celulas endoteliales transdiferenciadas a partir de celulas madre de gleatina de Wharton*. Language Design. Retrieved from <http://ddd.uab.cat/pub/landes/11394218v7p196.pdf>

- Vidal, M. a., Walker, N. J., Napoli, E., & Borjesson, D. L. (2012). Evaluation of Senescence in Mesenchymal Stem Cells Isolated from Equine Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Tissue. *Stem Cells and Development*, 21(2), 273–283. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0589>
- Wang, J.-J., Liu, Y.-L., Sun, Y.-C., Ge, W., Wang, Y.-Y., Dyce, P. W., ... Shen, W. (2015). Basic Fibroblast Growth Factor Stimulates the Proliferation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Plos One*, 10(9), e0137712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137712>
- Wang, X., Ma, S., Yang, B., Huang, T., Meng, N., Xu, L., ... Wang, J. (2018). Resveratrol promotes hUC-MSCs engraftment and neural repair in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 339, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.10.032>
- Weir, C., Morel-Kopp, M.-C., Gill, A., Tinworth, K., Ladd, L., Hunyor, S. N., & Ward, C. (2008). Mesenchymal stem cells: isolation, characterisation and in vivo fluorescent dye tracking. *Heart, Lung & Circulation*, 17(5), 395–403. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2008.01.006>
- Wurzer, S. (2012). *Effects of Interferon A on Mouse and Human Hematopoietic Stem Cells*. PhD. <https://doi.org/10.1002/2014GB005021>
- Xu, C., Rosler, E., Jiang, J., Lebkowski, J. S., Gold, J. D., O'Sullivan, C., ... Carpenter, M. K. (2005). Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells*, 23(3), 315–323. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0211>
- Yeoh, J. S. G., & de Haan, G. (2007). Fibroblast growth factors as regulators of stem cell self-renewal and aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.005>

- Zhang, M.-J., Sun, J.-J., Qian, L., Liu, Z., Zhang, Z., Cao, W., ... Xu, Y. (2011). Human umbilical mesenchymal stem cells enhance the expression of neurotrophic factors and protect ataxic mice. *Brain Research*, 1402, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.05.055>
- Zhao, Q., Ren, H., & Han, Z. (2015). Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.jocit.2014.12.001>
- Zheng, W., Nowakowski, R. S., & Vaccarino, F. M. (2004). Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Developmental Neuroscience*, 26(2–4), 181–196. <https://doi.org/10.1159/000082136>
- Ziaei, M., Zhang, J., Patel, D. V., & McGhee, C. N. J. (2017). Umbilical cord stem cells in the treatment of corneal disease. *Survey of Ophthalmology*, 62(6), 803–815. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2017.02.002>

ANEXOS

Anexo A. Protocolo

	PROTOCOLO DE NORMALIZACIÓN DEL TRABAJO	
---	---	---

CUANTIFICACIÓN CON AZUL DE TRIPÁN

OBJETIVO

Normalizar la metodología para la determinación de la densidad y viabilidad celular mediante el uso de cámara de Neubauer y el colorante de vitalidad Azul de tripano.

ALCANCE Aplicable al laboratorio de Biotecnología aplicada (LABIOAUT) y a todo protocolo que incluya conteo de células en suspensión.

CONDICIONES DE SEGURIDAD

Empleo de guantes de nitrilo y bata de laboratorio. Se debe tener precaución en el manejo del colorante azul de tripano, utilizado para la tinción de células viables, debido a que se han descrito propiedades teratogénicas y carcinogénicas de este colorante en modelos animales; aunque aún se desconocen los efectos a largo plazo en humanos.

EQUIPAMIENTO, LOCALES, MATERIALES Y REACTIVOS

Cámara de Neubauer □ Micropipeta de 10 a 100 μ l □ Puntas para micropipeta (amarillas) □ Azul de tripano Ref.15250-061Gibco Invitrogen □ Viales cónicos de 1-2 ml □ Microscopio óptico

OPERACIONES PRELIMINARES

Preparación de células en suspensión

MARCO TEÓRICO

A pesar del enorme desarrollo tecnológico que ha tenido lugar en los laboratorios científicos, el conteo visual con hematocitómetro sigue siendo el método de conteo más extendido desde el siglo XIX (Bastidas, 2012)

LA CÁMARA DE NEUBAUER, O HEMATOCITÓMETRO.

Se trata de una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. En una cámara simple, la porción central, que es donde se realiza el conteo, está dividida en 3 partes

En la parte central se encuentra grabada una retícula cuadrangular. En el caso de cámara doble, que son las más comunes, existen 2 zonas de conteo, una superior y otra inferior al eje longitudinal de la cámara.



Fig 1. Cámara de Neubauer comercial.

Típicamente, el rango de concentraciones que permite contar el hematocitómetro está entre 250.000 células y 2,5 millones de células por ml. La retícula completa mide 3 mm x 3 mm de lado. Subdividida a su vez en 9 cuadrados de 1mm de lado cada uno. Fig. 2

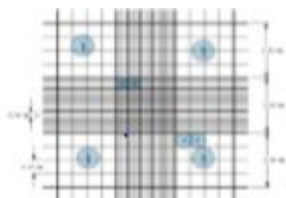


Figura 2. Rejilla de una cámara de Neubaer.

En caso de recuento de sangre, los cuadrados de las esquinas son los destinados al recuento de leucocitos. Al existir estos en menor número que los hematíes, se necesitan menos líneas de referencia para realizar el conteo.

El cuadrado central es el destinado al recuento de hematíes y plaquetas. Se divide en 25 cuadrados medianos de 0,25 mm de lado (Fig. 2, número 1 en círculo azul), y cada uno de estos cuadros se subdivide a su vez en 16 cuadrados pequeños.

El cuadrado central está por tanto formado por 400 cuadrados pequeños. En el presente protocolo, se describe como realizar un conteo celular con un hematocitómetro o cámara de Neubauer para estudiantes, técnicos o investigadores experimentados que deseen

recordar las bases del mismo. Aquí se describe paso a paso cómo realizar un recuento celular con hematocitómetro para obtener resultados fiables.

PROCEDIMIENTO

1. Preparar una solución de relación 1:10 de la siguiente forma: □ 10 µL de la solución que contiene las células □ 90 µL de azul de tripano
2. Homogenizar la muestra
3. Colocar el cubreobjetos sobre la cámara.



Figura 3. Ubicación del Cubreobjetos sobre la Cámara de Neubauer.

4. Por encima de 2,5 millones ($2,5 \times 10^6$) la probabilidad de cometer errores de conteo crece demasiado, y también el tiempo y esfuerzo necesario para realizar un recuento con fiabilidad. Por encima de esta concentración es conveniente diluir la muestra para acercar la concentración al rango óptimo.
5. Introducción de la muestra en la cámara de Neubauer.
6. 1. Se toman 10 uL de la mezcla preparada en el paso 1 con la micropipeta.
7. Se coloca la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara de Neubauer.
8. Se trata de dejar que el líquido penetre entre la cámara y el cubreobjetos desde el lateral, por capilaridad.
9. Se suelta el pistón suavemente mientras se supervisa que el líquido está entrando correctamente y de forma uniforme en la cámara. (Ver Fig.4)
10. En caso de que aparezcan burbujas, el cubreobjetos se haya movido o algo no haya salido bien, repetir la operación



Figura 4. Aplicación de la suspensión en la cámara de Neubauer

11. Observar en el microscopio óptico a 40X

12. Contar el número de células viables (las células que se observen de color blanco radiante en el interior) observadas en cada una de las 16 cuadrículas que aparecen en la zona L. Repetir el paso anterior en las demás secciones denotadas con L. (Como se muestra en la figura 5).

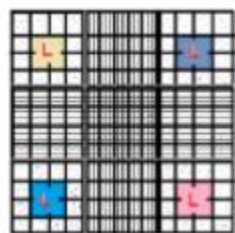


Figura 5. Divisiones para el conteo con Cámara de Neubauer

13. Realizar los cálculos como se muestra en el punto VIII.

CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS



Sumar los totales obtenidos en cada sección L y hallar el promedio entre los cuatro totales. □ Multiplicar el valor obtenido por 10 (dilución) y luego por 10.000. De esta manera se conocerá el número de células presentes en 1 ml de la solución en suspensión. □ Para determinar el volumen de muestra para obtener la densidad de siembra deseada se debe realizar la siguiente ecuación:
 $V1C1 = V2C2$ $V1 =$ Células presentes en 1 ml de sol. $V2 =$ 1 ml $C2 =$ Densidad de siembra

De esta manera se obtiene el Volumen requerido para sembrar la cantidad de células deseadas.

REFERENCIAS/DOCUMENTOS APLICABLES

Bressman PL, Seto F. 'Neural abnormalities induced by selected chemical agents'. Proc Okla Acad Sci 56: 10-14; 1976. Bastidas O. Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting. Obtenido de <http://celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>

ANEXO B

	PROTOCOLO DE NORMALIZACIÓN DEL TRABAJO	
---	---	---

Protocolo de tripsinización de Células Madre Mesenquimales aisladas de Cordón Umbilical

OBJETIVO:

Estandarizar la metodología de tripsinización del cultivo de células madre mesenquimales aisladas Cordón umbilical

ALCANCE:

Aplicable al laboratorio de Biotecnología aplicada (LABIOAUT)

Este procedimiento se llevara a cabo en un tiempo de 30 min por cada Flask.

RESPONSABILIDADES:

- 1. Implementación:** Será implementado por el Jefe de línea.
- 2. Ejecución:** Será ejecutado por el personal investigador relacionado.
- 3. Control:** .Será controlado por el Jefe de línea.

EQUIPAMIENTO, LOCALES, MATERIALES Y REACTIVOS:

- Cámara de flujo laminar
- Incubadora de CO₂
- Centrífuga
- Microscopio invertido
- Cajas de Petri
- Micropipetas

- Puntas
- Tubos Falcón de 15 ml y 50 ml

Drogas y Reactivos:

PBS (Buffer fosfato salino pH 7.4)

Trypsin-EDTA (0.25% Trypsin, EDTA) (2x) Gibco ref 15400-054

PBS (fosfato salino pH 7.4 1X).

OPERACIONES PRELIMINARES:

Adecuación del área de trabajo (Cuarto de Cultivo)

1. Limpiar la superficie interna de la cabina de Flujo laminar con peróxido de hidrógeno al 10% en dirección de adentro hacia fuera.
2. Encender la cámara de flujo, el aire acondicionado y la luz UV del cuarto de cultivo por lo menos 15 minutos antes del inicio del trabajo.
3. Apagar la Luz UV

CONDICIONES DE SEGURIDAD:

1. Tener un uso adecuado de los implementos especialmente las pipetas con las que será manipulado el cultivo celular.
2. Es indispensable el uso de tapabocas para disminuir el riesgo de contaminación.

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO:

El medio de cultivo debe mantenerse gaseado por lo menos durante 2h previas al inicio del procedimiento

1. La preparación del medio de cultivo contiene:

REACTIVO	VOLUMEN (V.final: 25 ml)
DMEM bajo en glucosa	19.375µl
SBF 20%	5.000µl
Penicilina/estreptomicina 1%	250µl
Anfotericina 1%	250 µl
I-glutamina 0,5%	125 µl

2. Diluir la tripsina a una concentración final de 5x, llevarla a la incubadora y atemperar a 37°C

PROCEDIMIENTO

Se utilizará un cultivo de células madre mesenquimales aisladas de cordón umbilical, que hayan alcanzado una confluencia del 80% al 100%.

1. Retirar el medio de cultivo.
2. Lavar una vez con 2-3 ml de PBS (fosfato salino pH 7.4). Durante 2 minutos realizando agitación suave con la mano.
3. Retirar el PBS
4. Para un Flask T25, adicionar al cultivo de 1 ml de solución de Tripsina- (5x) al 0.25 % durante un tiempo máximo de 5 min, a 37°C.
5. Observar al microscopio y agitar suavemente la caja de Petri, dando golpes suaves alrededor.

6. Realizar disgregación mecánica mediante una pipeta pasteur, previamente esterilizada. Las células se deben observar redondas en el microscopio cuando se han despegado, si las células aún no se observan de esta manera, realizar agitación nuevamente.
7. Bloquear la Tripsina utilizando 100uL de SFB (por el aporte de proteínas del suero, el inhibidor de tripsina presente en el suero, y el aporte de Calcio y Magnesio con el medio y el suero).
8. Llevar la solución celular a un tubo Falcon de 15 ml.
9. Realizar un lavado con DMEM bajo en glucosa completo a un volumen final máximo de 3ml y centrifugar 5 minutos a 1800 rpm.
10. Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 1ml de medio completo.
11. Realizar el conteo celular por cámara de Neubauer.
12. Sembrar las células teniendo en cuenta la densidad celular.

OBSERVACIONES.



1. No dejar las Células, con tripsina, más de 5 minutos, debido a que se afecta la viabilidad celular.

BIBLIOGRAFIA

Qiao, C., Xu, W., Zhu, W., Hu, J., Qian, H., Yin, Q., Chen, Y. (2008). Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biolog International*, 32(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.08.002>

Bonilla Porras, A.R., Avila-Gomez I.C., Mendivil-Perez, M.(2015).Protocolo de aislamiento, caracterización y criopreservación de células madre mesenquimales de cordón umbilical Universidad de Antioquia.

ANEXO C

	PROTOCOLO DE NORMALIZACIÓN DEL TRABAJO	
---	---	---

Inmunofenotipificación de CMM

OBJETIVO:

Estandarización de la técnica de Inmunofenotipificación para el marcaje de Células Madre Mesenquimales (CMM)

ALCANCE:

Afianzar conocimientos teóricos y prácticos acerca del establecimiento de cultivos primarios.

RESPONSABILIDADES:

Implantación. Responsable del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad del Tolima

Ejecución. Pasante, Tesista, auxiliar de laboratorio o investigación, u otra persona que se encuentre capacitada para la ejecución de este procedimiento

Control. Jefe del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad del Tolima.

EQUIPAMIENTO, MATERIALES Y REACTIVOS:

-Caja Multipozos

- N4HCl 50mM
- Solución de bloqueo 1
- Solución de bloqueo 2
- Anticuerpo primario:

Anticuerpo Primario	Dilución
CD44	1:200
CD29	1:200
CD90	1:300
CD45	1:250

Alexa
y Alexa fluor 405 antirabbit

- Anticuerpo
secundario:
fluor 488 antirat

OPERACIONES PRELIMINARES

Preparar N4HCl 50mM para evitar la autofluorescencia de las células.

Preparar Solución de bloqueo 1 adicionando 20ml de suero, 3ml de triton y llevando a volumen de 1000ml con PB 0.1M y solución de bloqueo 2 en las mismas proporciones pero excluyendo el suero

Preparar Anticuerpos primarios TH diluyendo el anticuerpo en solución de bloqueo 1 de acuerdo a lo requerido.

Preparar anticuerpos secundario Alexa 594 y Alexa 488 diluyendo el anticuerpo en solución de bloqueo 2 de acuerdo a lo requerido

CONDICIONES DE SEGURIDAD:

Manipular con precaución los reactivos

PROCEDIMIENTO:

- 1- Lavar cada pozo 2 veces con PB 0.1M por 5 minutos
- 2- Fijar las células con PFA durante toda la noche.
- 3- Retirar el paraformaldehído y realizar 5 lavados a cada pozo con PB 0,1M cada uno de 5 min
- 4- Lavar el pozo con N4HCl 50mM durante 10 minutos, esto, para evitar la autofluorescencia de las células.
- 5- Lavar con PB 0.1M 3 veces por 5 minutos
- 6- Lavar con solución de bloqueo 1 durante 20 minutos a 37°C
- 7- Incubar con Anticuerpo primario por un tiempo min de 16 horas y máximo 24 horas a 4°C
- 8- Lavar con PB 0.1M 3 veces por 5 minutos
- 9- Incubar Anticuerpo secundario por 2 horas a temperatura ambiente, en total oscuridad.
- 10- Lavar con PB 0.1M 5 veces por 5 minutos
- 11- Lavar con solución de bloqueo 1 durante 20 minutos a 37°C
- 12- Incubar el segundo Anticuerpo primario por un tiempo min de 16 horas y máximo 24 horas a 4°C
- 13- Lavar con PB 0.1M 3 veces por 5 minutos
- 14- Incubar Anticuerpo secundario por 2 horas a temperatura ambiente, en total oscuridad.
- 15- Lavar con PB 0.1M 5 veces por 5 minutos
- 16- Lavar con solución de bloqueo 1 durante 20 minutos a 37°C
- 17- Lavar con PB 0.1M 3 veces por 5 minutos
- 18- Dejar secar y observar al microscopio

CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS



Los resultados del procedimiento debe ser visto en un microscopio de fluorescencia en el que preferiblemente se puedan observar los dos colores al tiempo (Confocal) y es criterio del investigador verificar el éxito o falla del marcaje. Se recomienda usar un equipo de microscopia digital para facilitar el análisis de las imágenes.

REFERENCIAS/DOCUMENTOS APLICABLES

Kee, N., Teixeira, C., Wang, A. & Frankland, P. (2007). Imaging activation of adult-generated granule cells in spatial memory. *Nature Protocols*. 2(12), 3033 - 44. doi:10.1038/nprot.2007.415.

Leuner, B., Glasper, E., & Gould, E. (2009). Thymidine analog methods for studies of adult neurogenesis are not equally sensitive. *Journal of Comparative Neurology*. 517(2), 123 – 133. doi: 10.1002/cne.22107

ANEXO D

	PROTOCOLO DE NORMALIZACIÓN DEL TRABAJO	
---	---	---

Detección de Células Senescentes por medio de Tinción con B-galactosidasa

OBJETIVO:

Estandarización de la técnica de detección de células senescentes

ALCANCE:

Afianzar conocimientos teóricos y prácticos acerca de técnicas de tinción.

RESPONSABILIDADES:

Implantación. Responsable del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad del Tolima

Ejecución. Pasante, Tesista, auxiliar de laboratorio o investigación, u otra persona que se encuentre capacitada para la ejecución de este procedimiento

Control. Jefe del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad del Tolima.

EQUIPAMIENTO, MATERIALES Y REACTIVOS:

1. Caja Multipozos
2. Paraformaldehído (PFA) - 4%
3. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β D-galactopiranosido (X-gal)
4. Ferrocianuro de Potasio
5. Ferricianuro de potasio
6. Buffer Fosfato Salino (PBS)
7. Hidróxido de Sodio
8. Dimetilformamida
9. Cloruro de Sodio
10. Cloruro de Magnesio

11. Sodio di-básico Fosfato.

12. Ácido cítrico

13. Fosfato de Sodio

OPERACIONES PRELIMINARES

Preparar paraformaldehído (PFA): Para hacer 200 ml de 4% de PFA, disolver 8 g de PFA en 50ml de PB (0,1M) y 150mL de H₂O D.D , en agitación continua en una placa caliente (con la solución no superior a 60 ° C). Alícuota y congelación a -20 ° C para almacenamiento a largo plazo.

Preparar Solución de tinción de β -galactosidasa (SA- β -gal): Para preparar X-gal al 10% en dimetilformamida (DMF), disolver 500 mg de X-gal en 5 ml de DMF. Almacene la solución stock X-gal a -20 ° C

Preparar solución Citrato de Sodio 400 mM : Agregar 36,85 ml de ácido cítrico 0,1 M a 63,15 ml de fosfato sódico dibásico 0,2 M. Verificar el pH y ajustar a pH 6.0 con ácido cítrico 0,1 M, si es necesario.

Preparación Solución de Tinción 1800 μ L. Ferrocianuro de potasio 0,5 M (45 μ L) Ferricianuro de potasio 0,5M.(μ L), MgCl₂ 0,2M (18 μ L), NaCl 0,15M (45 μ L) , X-gal (18 μ L), Solución citrato de sodio (1629 μ L).Almacenar en oscuridad a 4 ° C, pH 6.0.

CONDICIONES DE SEGURIDAD:

Manipular con precaución los reactivos, utilizar guantes y tapabocas, preferiblemente gafas de seguridad, debido a que se desprenden Vapores tóxicos,

PROCEDIMIENTO:

- 19- Lavar cada pozo 2 veces con PB 0.1M por 5 minutos
- 20- Fijar las células con PFA durante toda la noche.
- 21- Retirar el paraformaldehído y realizar 5 lavados a cada pozo con PB 0,1M cada uno de 5 min
- 22- Agregar la solución de Tinción SA- β -gal a cada pozo (debe cubrir completamente el pozo).

- 23- Incubar las células a 37°C durante 24h, en oscuridad.
- 24- Retirar la solución de Tinción
- 25-** Lavar cada pozo 3 veces con PB 0.1M por 5 minutos
- 26- Observar las células por medio de un microscopio invertido.

OBSERVACIONES.

El tiempo de incubación de las células junto con la tinción, varía dependiendo del Tipo celular.

Tipo Celular	Tiempo de Incubación de la tinción
CMM-gW	24h
CMM-Mor	48h
T-98g	12h

La preparación del PFA debe realizarse bajo Cabina de extracción y con precaución debido a la toxicidad del reactivo.



Se recomienda filtrar la solución de tinción para disminuir la presencia de cristales, observables al microscopio.

BIBLIOGRAFIA

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. and et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9363-9367.

Eccles, M., & Li, C. G. (2011). Senescence Associated β -galactosidase Staining. *Oncogene*.

ANEXO E

	PROTOCOLO DE NORMALIZACIÓN DEL TRABAJO	
---	---	---

Detección de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) mediante kit tal referencia tal

OBJETIVO:

Estandarización de la técnica de detección de especies reactivas de Oxígeno (ROS)

ALCANCE:

Afianzar conocimientos teóricos y prácticos acerca de técnicas de tinción.

RESPONSABILIDADES:

Implantación. Responsable del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad del Tolima

Ejecución. Pasante, Tesista, auxiliar de laboratorio o investigación, u otra persona que se encuentre capacitada para la ejecución de este procedimiento

Control. Jefe del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad del Tolima.

EQUIPAMIENTO, MATERIALES Y REACTIVOS:

- 14.1- Caja Multipozos
- 15. Paraformaldehído (PFA) - 4%
- 16. Kit de detección ROS (Abcam)
- 17. PBS
- 18. Floid

OPERACIONES PRELIMINARES

1 Reconstituir el reactivo ROS Orange Dye: agregando 40 µL de DMSO, Mezclar y alicuotar, almacenar a 20 ° C con la tapa sellada herméticamente en oscuridad, Evitar ciclos de congelación-descongelación.

CONDICIONES DE SEGURIDAD:

Manipular con precaución los reactivos, utilizar guantes.

PROCEDIMIENTO:

- 1- Lavar cada pozo 2 veces con PBS 1X por 2 minutos
- 2- Agregar 1 uL de la solución de tinción ROS en 500uL del Buffer de Ensayo
- 3- Incubar a 37°C en 5% de CO₂ en total oscuridad, durante 2 h
- 4- Fijar las células con PFA durante toda la noche A 4°C.
- 5- Retirar el paraformaldehído y realizar 2 lavados a cada pozo con PBS 1X.
- 6- Visualizar en el FLOID.



OBSERVACIONES.

- Realizar el procedimiento en total oscuridad
- Tener precaución con la manipulación de los reactivos.
- Realizar este procedimiento cuando las células estén en el 50% de confluencia, para una mejor visualización en el FLOID.

REFERENCIAS/DOCUMENTOS APLICABLES

Abcam. (2016). Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (Orange Fluorescence), (December). Retrieved from <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.92.20.9363>

ANEXO F

	PROTOCOLO DE NORMALIZACIÓN DEL TRABAJO	
---	---	---

TÍTULO: DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS

I.-OBJETIVO

Usar las alícuotas de células congeladas ya sea para su expansión o para su aplicación.

II.-ALCANCE

Este procedimiento puede realizarse en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad del Tolima o en cualquier otro laboratorio que disponga de las condiciones para su ejecución.

III.-RESPONSABILIDADES

Implantación. Responsable del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad del Tolima

Ejecución. Pasante, Tesista, auxiliar de laboratorio o investigación, u otra persona que se encuentre capacitada para la ejecución de este procedimiento

Control. Jefe del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad del Tolima

IV.-CONDICIONES DE SEGURIDAD

El personal deberá portar los elementos básicos de seguridad dentro del laboratorio: bata, tapabocas, gorro y polainas.

V.-EQUIPAMIENTO, LOCALES, MATERIALES Y REACTIVOS

- Tubos Falcon de 15ml
- Pipetas Falcon 5ml y 10ml
- D-PBS 1X Gibco INVITROGEN
- Medio de cultivo DMEM 1X GIBCO/INVITROGEN
- Suero autólogo, suero fetal bovino o Serum substitute supplement
- Incubadora
- Jeringas de 1ml, 5ml y 10ml
- Baño serológico
- Cabina de flujo laminar vertical
- Microscopio invertido
- Nevera

VI.-OPERACIONES PRELIMINARES

En el momento que se decide descongelar un vial de células debemos tener todos los elementos necesarios para su procesamiento a la mano.

VII.-PROCEDIMIENTO

1. Inmediatamente después de sacar las células del nitrógeno líquido o del congelador de -80°C procedemos a colocar el vial en baño maría a 37°C, durante un minuto o hasta su descongelación
2. Resuspender la solución de congelación en 10ml de medio de cultivo DMEM suplementado con 20% SFB y antibiótico; 100 U/ml penicilina 100 mg/ml estreptomicina, previamente atemperado a 37°C
3. Resuspender suavemente con una pipeta pasteur y llevar a centrifuga a 1200 rpm durante 5 min.
4. El pellet obtenido se resuspende nuevamente en 1ml de medio de cultivo DMEM suplementado como se mencionó anteriormente y se toma una alícuota de 20ul para evaluar su viabilidad celular
5. Luego del recuento, se cultivan las células en un frasco T50 o 75 según corresponda la cantidad de células

VIII.-CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

IX.REFERENCIAS/DOCUMENTOS APLICABLES

- Boletín Técnico Sigma; ST Louis, MO; <http://www.sigmaaldrich.com>
- Celis, J. Cell Biology. A Laboratory Handbook. 2° Vol 1. Department of medical Biochemistry. Universidad de Aarhus, Dinamarca. 2002. 133-142
- Freshney R. Culture of Animal cells. A manual of basic technique. 4° ed. 2000.
- Sambrook, J. Molecular Cloning, *A Laboratory Manual*, 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. 2001

- Stewart, Sell. Stem Cells Handbook. 1°ed. Humana Press. Wadsworth Center and Ordway. Research Institute Empire State Plaza, Albany, NY. 2004

ANEXO G. Análisis Estadístico

1- Viabilidad de Núcleos

1.1 Prueba de normalidad de Shapiro –Wilks. Pasaje 5

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Núcleos Condensados	20	37,22	33,78	0,74	<0,0001
Núcleos Fragmentados	20	8,25	9,31	0,82	0,0014
Núcleos sin daños	20	54,53	33,43	0,79	<0,0001

Se considera que los datos son normales cuando el valor —p es mayor a 0.05.

1.2 Prueba de Kruskal Wallis, para datos no paramétricos. Pasaje 5.

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	H	p
Núcleos Condensados	Control (-)	5	21,27	9,31	11,55	0,0090
Núcleos Condensados	Control (+)	5	92,33	7,30		
Núcleos Condensados	FGF2 (3,5ng)	5	16,49	8,72		
Núcleos Condensados	FGF2 (7,5ng)	5	18,79	11,33		

Trat.	Medias	Ranks
FGF2 (3,5ng)	16,49	6,60 A
FGF2 (7,5ng)	18,79	7,50 A
Control (-)	21,27	9,90 A
Control (+)	92,33	18,00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	H	p
Núcleos Fragmentados	Control (-)	5	17,68	10,58	6,04	0,0977
Núcleos Fragmentados	Control (+)	5	5,45	7,68		
Núcleos Fragmentados	FGF2 (3,5ng)	5	3,45	4,68		
Núcleos Fragmentados	FGF2 (7,5ng)	5	6,41	8,04		

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	H	p
Núcleos sin daños	Control (-)	5	61,05	18,24	12,81	0,0049
Núcleos sin daños	Control (+)	5	2,22	4,97		
Núcleos sin daños	FGF2 (3,5ng)	5	80,05	10,83		
Núcleos sin daños	FGF2 (7,5ng)	5	74,80	5,69		

Trat.	Medias	Ranks
Control (+)	2,22	3,00 A
Control (-)	61,05	10,20 A B
FGF2 (7,5ng)	74,80	13,20 B
FGF2 (3,5ng)	80,05	15,60 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

1.3 Prueba de normalidad de Shapiro –Wilks. Pasaje 7

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Nucleos Fragmentados	20	7,64	9,02	0,78	<0,0001
Nucleos Condensados	20	36,76	38,52	0,68	<0,0001
Nucleos sin Daños	20	56,77	36,15	0,77	<0,0001

1.4 Prueba de Kruskal Wallis, para datos no paramétricos. Pasaje 7

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	H	p
Nucleos Fragmentados	Control (-)	5	8,69	8,94	10,55	0,0072
Nucleos Fragmentados	Control (+)	5	0,00	0,00		
Nucleos Fragmentados	FGF2 (3,5ng)	5	17,90	7,37		
Nucleos Fragmentados	FGF2 (7,5ng)	5	3,96	5,45		

Trat.	Medias	Ranks
Control (+)	0,00	5,50 A
FGF2 (7,5ng)	3,96	8,10 A
Control (-)	8,69	11,40 A B
FGF2 (3,5ng)	17,90	17,00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	H	p
Nucleos Condensados	Control (-)	5	25,39	11,67	13,42	0,0035
Nucleos Condensados	Control (+)	5	100,00	0,00		
Nucleos Condensados	FGF2 (3,5ng)	5	9,31	4,75		
Nucleos Condensados	FGF2 (7,5ng)	5	12,33	6,31		

Trat.	Medias	Ranks
FGF2 (3,5ng)	9,31	5,40 A
FGF2 (7,5ng)	12,33	7,20 A
Control (-)	25,39	11,40 A B
Control (+)	100,00	18,00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	H	p
Nucleos sin Daños	Control (-)	5	66,42	11,28	12,67	0,0049
Nucleos sin Daños	Control (+)	5	0,00	0,00		
Nucleos sin Daños	FGF2 (3,5ng)	5	81,67	9,25		
Nucleos sin Daños	FGF2 (7,5ng)	5	79,00	21,39		

Trat.	Medias	Ranks
Control (+)	0,00	3,00 A
Control (-)	66,42	10,00 A B
FGF2 (3,5ng)	81,67	14,20 B
FGF2 (7,5ng)	79,00	14,80 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

2- Inmunofenotípificación

2.1 Prueba de normalidad de Shapiro –Wilks. Pasaje 5

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
CD45	30	5,37	8,19	0,68	<0,0001
CD29	30	98,23	4,90	0,41	<0,0001
CD90	30	100,00	0,00	sd	>0,9999
CD44	30	96,27	7,54	0,57	<0,0001

Prueba de Kruskal Wallis, para datos no paramétricos. Pasaje 5

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	H	p
CD45	Control	10	7,25	10,02	6,74	0,0109
CD45	FGF-2 3,5ng	10	8,87	8,15		
CD45	FGF-2 7,5ng	10	0,00	0,00		

Trat.	Medias	Ranks
FGF-2 7,5ng	0,00	10,00 A
Control	7,25	16,40 A B
FGF-2 3,5ng	8,87	20,10 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	H	p
CD29	Control	10	98,33	5,27	1,24	0,1684
CD29	FGF-2 3,5ng	10	96,35	6,49		
CD29	FGF-2 7,5ng	10	100,00	0,00		

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	H	p
CD90	Control	10	100,00	0,00	0,00	sd
CD90	FGF-2 3,5ng	10	100,00	0,00		
CD90	FGF-2 7,5ng	10	100,00	0,00		

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	H	p
CD44	Control	10	94,42	9,66	2,45	0,1077
CD44	FGF-2 3,5ng	10	94,40	8,18		
CD44	FGF-2 7,5ng	10	100,00	0,00		

2.2 Prueba de normalidad de Shapiro –Wilks. Pasaje 7

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
CD90	30	100,00	0,00	sd	>0,9999
CD 44	30	100,00	0,00	sd	>0,9999
CD29	30	100,00	0,00	sd	>0,9999
CD45	30	0,00	0,00	sd	>0,9999

4 Senescencia de CMM-gW

4.1 Prueba de normalidad de Shapiro –Wilks. Pasaje 5

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Celulas Totales	20	73,33	18,70	0,84	0,0040
Celulas Senescentes	20	26,56	18,61	0,84	0,0040

4.2 Prueba de Kruskal Wallis, para datos no paramétricos. Pasaje 5.

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Celulas Totales	Control (-)	5	70,17	12,42	75,00	14,02	0,0025
Celulas Totales	Control (+)	5	50,00	0,00	50,00		
Celulas Totales	FGF-2 (3,5ng)	5	80,40	12,57	88,88		
Celulas Totales	FGF-2 (7,5ng)	5	92,76	11,05	100,00		

Trat.	Medias	Ranks	
Control (+)	50,00	3,00	A
Control (-)	70,17	9,60	B
FGF-2 (3,5ng)	80,40	13,00	B
FGF-2 (7,5ng)	92,76	16,40	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Celulas Senescentes	Control (-)	5	29,43	11,84	25,00	14,22	0,0022
Celulas Senescentes	Control (+)	5	50,00	0,00	50,00		
Celulas Senescentes	FGF-2 (3,5ng)	5	19,59	12,57	11,11		
Celulas Senescentes	FGF-2 (7,5ng)	5	7,22	11,04	0,00		

Trat.	Medias	Ranks	
FGF-2 (7,5ng)	7,22	4,40	A
FGF-2 (3,5ng)	19,59	8,20	A
Control (-)	29,43	11,40	B
Control (+)	50,00	18,00	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

4.3 Prueba de normalidad de Shapiro –Wilks. Pasaje 7

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Celulas senescentes	20	38,96	14,65	0,77	<0,0001
Celulas Totales	20	61,03	14,65	0,77	<0,0001

4.4 Prueba de Kruskal Wallis, para datos no paramétricos. Pasaje 7

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	H	p
Celulas senescentes Control (-)		5	50,00	0,00	15,02	0,0007
Celulas senescentes Control (+)		5	50,00	0,00		
Celulas senescentes FGF-2 (3,5ng)		5	34,74	8,95		
Celulas senescentes FGF-2 (7,5ng)		5	21,12	14,64		

Trat.	Medias	Ranks	
FGF-2 (7,5ng)	21,12	3,90	A
FGF-2 (3,5ng)	34,74	7,10	A
Control (+)	50,00	15,50	B
Control (-)	50,00	15,50	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	H	p
Celulas Totales Control (-)		5	50,00	0,00	15,02	0,0007
Celulas Totales Control (+)		5	50,00	0,00		
Celulas Totales FGF-2 (3,5ng)		5	65,26	8,95		
Celulas Totales FGF-2 (7,5ng)		5	78,87	14,65		

Trat.	Medias	Ranks	
Control (+)	50,00	5,50	A
Control (-)	50,00	5,50	A
FGF-2 (3,5ng)	65,26	13,90	B
FGF-2 (7,5ng)	78,87	17,10	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

4.5 Prueba de normalidad de Shapiro –Wilks. Pasaje 5 para áreas

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Area Senescente	92	0,01	0,02	0,72	<0,0001
Area Total	92	0,09	0,06	0,72	<0,0001

4.6

Prueba de Kruskal Wallis, para datos no paramétricos, áreas Pasaje 5.

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	H	p
Area Senescente	Control (-)	21	4,0E-03	0,01	40,17	<0,0001
Area Senescente	Control (+)	23	0,04	0,01		
Area Senescente	FGF-2 (3,5ng)	24	0,01	0,01		
Area Senescente	FGF-2 (7,5ng)	24	0,01	0,02		

Trat.	Medias	Ranks
Control (-)	4,0E-03	32,71 A
FGF-2 (7,5ng)	0,01	33,88 A
FGF-2 (3,5ng)	0,01	42,60 A
Control (+)	0,04	76,33 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	H	p
Area Total	Control (-)	21	0,05	0,02	35,88	<0,0001
Area Total	Control (+)	23	0,09	0,02		
Area Total	FGF-2 (3,5ng)	24	0,08	0,05		
Area Total	FGF-2 (7,5ng)	24	0,13	0,09		

Trat.	Medias	Ranks
Control (-)	0,05	20,55 A
FGF-2 (3,5ng)	0,08	41,40 B
Control (+)	0,09	55,26 B C
FGF-2 (7,5ng)	0,13	65,92 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

5 Estrés Oxidativo


5.1 Prueba de Kruskal Wallis, para datos no paramétricos

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	H	p
Pasaje 5 Control (-)		3	38,95	28,95	4,07	0,2544
Pasaje 5 Control (+)		3	66,10	11,14		
Pasaje 5 FGF-2 (3,5ng)		4	44,43	14,04		
Pasaje 5 FGF-2 (7,5ng)		4	47,65	5,95		

Variable	Grupo	N	Medias	D.E.	H	p
Pasaje 7 Control (-)		4	29,06	9,89	17,34	0,0006
Pasaje 7 Control (+)		7	57,97	10,06		
Pasaje 7 FGF-2 (3,5ng)		6	19,87	4,96		
Pasaje 7 FGF-2 (7,5ng)		7	15,17	4,83		

Trat.	Medias	Ranks
FGF-2 (7,5ng)	15,17	5,86 A
FGF-2 (3,5ng)	19,87	9,67 A
Control (-)	29,06	13,50 A B
Control (+)	57,97	21,00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

 Universidad del Tolima	PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 1 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Los suscritos:

Andrea Catalina Rubio Vargas

con C.C N°

1110548070

Manifiesto (an) la voluntad de:

Autorizar

☒

No Autorizar

☐

Motivo:

La consulta en físico y la virtualización de **mi OBRA**, con el fin de incluirlo en el repositorio institucional de la Universidad del Tolima. Esta autorización se hace sin ánimo de lucro, con fines académicos y no implica una cesión de derechos patrimoniales de autor.

Manifestamos que se trata de una OBRA original y como de la autoría de LA OBRA y en relación a la misma, declara que la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA, se encuentra, en todo caso, libre de todo tipo de responsabilidad, sea civil, administrativa o penal (incluido el reclamo por plagio).

Por su parte la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA se compromete a imponer las medidas necesarias que garanticen la conservación y custodia de la obra tanto en espacios físico como virtual, ajustándose para dicho fin a las normas fijadas en el Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad, en la Ley 23 de 1982 y demás normas concordantes.

La publicación de:

Trabajo de grado

☒

Artículo

Proyecto de Investigación

Libro


Parte de libro

Documento de conferencia

Patente

Informe técnico

Otro: (fotografía, mapa, radiografía, película, video, entre otros)

 Universidad del Tolima	PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 2 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Producto de la actividad académica/científica/cultural en la Universidad del Tolima, para que con fines académicos e investigativos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad del Tolima. Con todo, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada con arreglo al artículo 30 de la Ley 23 de 1982. En concordancia suscribo este documento en el momento mismo que hago entrega del trabajo final a la Biblioteca Rafael Parga Cortes de la Universidad del Tolima.

De conformidad con lo establecido en la Ley 23 de 1982 en los artículos 30 “**...Derechos Morales. El autor tendrá sobre su obra un derecho perpetuo, inalienable e irrenunciable**” y 37 “**...Es lícita la reproducción por cualquier medio, de una obra literaria o científica, ordenada u obtenida por el interesado en un solo ejemplar para su uso privado y sin fines de lucro**”. El artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “**los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores**” y en su artículo 61 de la Constitución Política de Colombia.

- Identificación del documento: 1110548070

Título completo: **EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTISENESCENTE DEL FACTOR DE CRECIMIENTOFIBROBLÁSTICO-2 (FGF-2) MEDIANTE LA CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE UN CULTIVO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE GELATINA DE WHARTON (CMM-gW)**

- Trabajo de grado presentado para optar al título de:

Biólogo


- Proyecto de Investigación correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

- Informe Técnico correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

- Artículo publicado en revista:

- Capítulo publicado en libro:

- Conferencia a la que se presentó:

 Universidad del Tolima	PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 3 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Quienes a continuación autentican con su firma la autorización para la digitalización e inclusión en el repositorio digital de la Universidad del Tolima, el:

Día: **29** Mes: **MAYO** Año: **2018**

Autores:

Firma

Nombre: Andrea Catalina Rubio Vargas  C.C. 1110548070

El autor y/o autores certifican que conocen las derivadas jurídicas que se generan en aplicación de los principios del derecho de autor.